

Máster en Nuevos Alimentos

Estudio de isomerasas microbianas para la obtención de carbohidratos raros con propiedades bioactivas

Paula López Revenga



FACULTAD DE
CIENCIAS

Directora: Antonia Montilla Corredera
Director: Francisco Javier Moreno Andújar
Tutor: Luis Vázquez de Frutos

Lugar de realización: Instituto de Investigación en Ciencias de
la Alimentación / Grupo de Química y funcionalidad de
carbohidratos y derivados.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y por todo el esfuerzo realizado quiero dar las gracias a mi tutora de TFM la Dr. Antonia Montilla que desde el primer día que me acogió en el grupo me ha ayudado en todo lo que he necesitado, le doy las gracias también por su paciencia. Gracias al Dr. Javier Moreno por su ayuda, sin ambos este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias por supuesto a mi familia y en especial a mis padres, Marta y Pablo, a mis tíos Miguel Ángel y Raquel, mis primos Lucía y Hugo y mi tía Puri, en especial en este año tan duro que nos ha tocado, gracias también a Adrián por acompañarme hasta en los peores momentos.

No puedo dejar de agradecer a todos mis compañeros y amigos de laboratorio, en especial a Paloma, Nerea, Pablo M., Diego y Agustina, gracias de verdad por los buenos momentos en el CIAL y por levantarme el ánimo cuando lo necesitaba. Gracias a Carlos por enseñarme todo lo que me enseñó en mis prácticas a mi llegada al grupo.

Gracias también a mis amigas Laura, Carmen y Begoña por todos los momentos que hemos vivido en la carrera tanto los buenos como los no tan buenos. Gracias a Nerea por alegrarme todos los domingos y hacer la jornada laboral mucho más amena.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. LOS CARBOHIDRATOS.....	1
2.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	1
2.1.2. LOS CARBOHIDRATOS EN LA DIETA.....	3
2.1.2.1. CARBOHIDRATOS BIOACTIVOS.....	3
2.1.2.2. SUSTITUCIÓN DE CARBOHIDRATOS CALÓRICOS.....	4
2.2. AZÚCARES RAROS Y SU OBTENCIÓN POR ISOMERIZACIÓN.....	5
2.2.1. ISOMERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	6
2.2.1.1 GLUCOSA-ISOMERASA.....	9
2.2.1.2 SACAROSA-ISOMERASA.....	11
2.2.2. ISOMERIZACIÓN QUÍMICA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
4.1. REACTIVOS Y MUESTRAS.....	14
4.2. ISOMERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	15
4.2.1. GLUCOSA-ISOMERASA.....	15
4.2.2. SACAROSA-ISOMERASA.....	15
4.3. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS, GC-FID.....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5.1. GLUCOSA-ISOMERASA (EC 5.3.1.5). ESTUDIO SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO.....	18
5.1.1. PROCESO DE ISOMERIZACIÓN DE LA D-GLUCOSA.....	18
- ISOMERIZACIÓN DE LA L-GLUCOSA.....	19
5.1.2. ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE PENTOSAS.....	21
5.1.2.1. PROCESO DE ISOMERIZACIÓN DE LA D-XILOSA.....	21
- ISOMERIZACIÓN DE LA L-XILOSA.....	25
5.1.2.2. ISOMERIZACIÓN DE LA L-ARABINOSA.....	25
- ISOMERIZACIÓN DE LA D-ARABINOSA.....	27
5.1.2.3. ISOMERIZACIÓN DE LA D-RIBOSA.....	29
5.1.3. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE HEXOSAS.....	31
- ISOMERIZACIÓN DE LA L-RAMNOSA.....	31
- ISOMERIZACIÓN DE LA D-GALACTOSA.....	33
5.1.4. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE DISACÁRIDOS.....	34
5.2 SACAROSA-ISOMERASA (EC 5.4.99.11): ESTUDIO SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO.....	36

5.2.1 PROCESO DE ISOMERIZACIÓN DE LA SACAROSA.....	36
5.2.2 ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE DIVERSOS DISACÁRIDOS.....	40
5.2.2.1. ISÓMEROS DE LA SACAROSA.....	40
- ENSAYO CON ISOMALTULOSA.....	40
- ENSAYO CON LEUCROSA.....	42
- ENSAYO CON TURANOSA.....	43
5.2.2.2. ENSAYO CON ISOMALTOSA.....	44
6. CONCLUSIONES.....	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura I1.** Ejemplo de los tres tipos de enzimas empleadas para la producción de D-tagatosa. Galactitol-deshidrogenasa (GalDH), D-tagatosa-3-epimerasa (D-TE) y L-arabinosa-isomerasa (L-AI). Fuente: Beerens *et al.*, (2012).....8
- Figura I2.** Proceso de isomerización de la glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5). Fuente: PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.....9
- Figura I3.** Proceso de isomerización de la sacarosa-isomerasa (EC 5.4.9.11). Fuente: BRENDA. <https://www.brenda-enzymes.org/>.....11
- Figura R1.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la D-glucosa con Sweetzyme[®] IT Extra, pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-glucosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 3 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) D-fructosa, (3 y 4) D-glucosa.....18
- Figura R2.** Cinética de isomerización de la D-glucosa (0,3 g/mL) empleando Sweetzyme[®] IT Extra (40 IGIU/g) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, 60°C: (▲) glucosa (%); (●) fructosa (%)......19
- Figura R3.** Proyección de Fischer D-glucosa y L-glucosa. Fuente: Adaptado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fischer_projection_of_D-_and_L-Glucose.svg.....20
- Figura R4.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de L-glucosa (rojo) y D-glucosa (azul) con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de glucosa y 0,075 g/mL de enzima, a las 24 horas. Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa.....20
- Figura R5.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la isomerización de D-xilosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL D-xilosa y 0,075 g/mL de enzima, tras 24 horas de reacción. Picos identificados: (2 y 4) D-xilulosa, (3 y 5) D-xilosa, (7 y 8) D-ribosa. Picos (1 y 6) tentativamente D-lixosa..... 22
- Figura R6.** Esquema reacción de isomerización y epimerización de la D-Xilosa.....22
- Figura R7.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la reacción de isomerización de la L-xilosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-xilosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 24 horas. Picos identificados: (1 y 2) L-xilosa.....25
- Figura R8.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la L-arabinosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-arabinosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul) Picos identificados: (3) L-ribulosa, (4 y 5) L-arabinosa, (6 y 7) L-ribosa. Picos (1 y 2) pentosa no identificada.....26
- Figura R9.** Perfiles cromatográficos de la isomerización de la D-arabinosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-arabinosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (3) D-ribulosa, (4 y 5) D-arabinosa, (6 y 7) D-ribosa. Picos (1 y 2) Pentosa no identificada.....28

Figura R10. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la D-ribosa con Sweetzyme® IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-ribosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (3) D-ribulosa, (4 y 5) D-arabinosa, (6) D-ribosa. Picos (1 y 2) pentosa no identificada.....30

Figura R11. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la L-ramnosa con Sweetzyme® IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-ramnosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 3 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) L-ramnulosa, (3 y 4) L-ramnosa.....32

Figura R12. Cromatograma obtenido del análisis por GC-FID de la isomerización de la D-galactosa con glucosa-isomerasa a tiempo 4 horas. Picos: (1,2) D-tagatosa, (3,4) posible talosa, (5,6) D-galactosa.....33

Figura R13. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de xilooligosacáridos (XOS) con Sweetzyme® IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de XOS y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). a) Picos identificados: (10 y 11) Xilobiosa. b y c) (1 y 3) xilulosa, (2 y 4) xilosa, (6 y 7) fructosa, (8 y 9) glucosa. Pico (5) pentosa no identificada.....35

Figura R14. Representación del proceso de isomerización de la sacarosa-isomerasa a partir de la sacarosa.....37

Figura R15. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la sacarosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de sacarosa y 10⁻³mg/mL de enzima a tiempo 0 (rojo), 0,5 (azul) y 24 horas (verde). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (7) sacarosa, (8 y 9) leucrosa, (10 y 11) trehalulosa, (12 y 13) isomaltulosa, y (14 y 15) isomaltosa. Picos (5 y 6) compuestos no identificados.....38

Figura R16. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la isomaltulosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de isomaltulosa y 10⁻³ mg/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (7) leucrosa, (8 y 9) trehalulosa, (10 y 11) isomaltulosa, y (12 y 13) isomaltosa. . Picos (5 y 6) compuesto no identificado.....41

Figura R17. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la leucrosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de leucrosa y 10⁻³mg/mL sacarosa-isomerasa a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (8) leucrosa, (9 y 10) trehalulosa, (11 y 12) isomaltulosa, (13 y 14) isomaltosa. Picos (5, 6 y 7) compuesto no identificado.....42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I1. Tabla comparativa del poder edulcorante de distintos carbohidratos empleados por la industria alimentaria en base a la sacarosa (=1).....	5
Tabla I2. . Carbohidratos denominados “raros” y su uso en la industria. Fuente: Cervantes (2021).....	6
Tabla I3. Principales empresas, marcas registradas y microorganismo productor de glucosa-isomerasa.....	10
Tabla I4. Principales microorganismos productores de sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11).....	12
Tabla R1. Datos obtenidos de la isomerización de D-xilosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	23
Tabla R2. Datos obtenidos de la isomerización de D-xilosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).	24
Tabla R3. Datos obtenidos de la isomerización de L-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	26
Tabla R4. Datos obtenidos de la isomerización de L-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	27
Tabla R5. Datos obtenidos de la isomerización de D-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	28
Tabla R6. Datos obtenidos de la isomerización de D-ribosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	31
Tabla R7. Datos obtenidos de la isomerización de L-ramnosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....	32
Tabla R8. Datos obtenidos de la isomerización de L-fucosa (0,3 g/mL) D-fucosa (0,3 g/mL), D-manosa (0,3 g/mL) y D-galactosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme [®] IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de	

reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar). D-fucosa no se realizaron duplicados.....34

Tabla R9. Datos obtenidos de la isomerización de maltosa (0,3 g/mL), lactosa (0,3 g/mL) y melibiosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme ® IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....34

Tabla R10. Datos obtenidos de la isomerización de sacarosa (0,2 g/mL), empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$), pH 5, a 30 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar). A tiempo 6 horas no se obtuvieron duplicados.....39

Tabla R11. Datos obtenidos de la isomerización de isomaltulosa (0,2 g/mL), empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$), pH 5, a 30 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales.....41

Tabla R12. Datos obtenidos de la isomerización de disacáridos isómeros de la sacarosa (0,2 g/mL), obtenidos durante la reacción a 30°C a las 24 horas de reacción empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$), pH 5. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).....43

1 RESUMEN

Los carbohidratos poco comunes o también denominados “raros”, que están presentes en cantidades limitadas en la naturaleza, son considerados compuestos de alto interés debido a sus posibles aplicaciones, entre las que cabe destacar su papel como sustituto de los azúcares tradicionales sacarosa y glucosa, gracias a su capacidad edulcorante y bajo contenido en calorías. Además, algunos de ellos pueden poseer otras propiedades funcionales de interés y se podrían considerar dentro de los denominados edulcorantes de segunda generación, que por su naturaleza están permitidos y son totalmente seguros para su uso en alimentos.

Existen diversas metodologías para la obtención de estos carbohidratos “raros” a partir de los comunes, presentes en elevada cantidad en subproductos de la industria agroalimentaria, pudiendo jugar un papel importante en cuanto al aprovechamiento de los residuos agrarios. Entre estas metodologías cabe destacar el empleo de enzimas del grupo de las isomerasas (EC 5), catalizadores muy potentes y seguros. Este trabajo se ha centrado en el estudio de la especificidad de sustrato de dos enzimas que catalizan una reacción de isomería estructural funcional, una glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5) comercial de *Streptomyces murinus* (Sweetzyme® IT Extra) que interconvierte las aldosas (glucosa y xilosa) en cetosas (fructosa y xilulosa) y una sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11) de *Erwinia rhapontici* que modifica el enlace glicosídico de la sacarosa para obtener isomaltulosa.

Se ha estudiado la isomerización de distintos tipos de carbohidratos comprobándose con Sweetzyme® IT Extra que tiene especificidad de sustrato para monosacáridos, obteniéndose rendimientos inferiores al 60% ya que se trata de reacciones reversibles. Además, el enzima presenta elevada estereoespecificidad para D-glucosa y D-xilosa.

En cuanto a la especificidad de sustrato de la sacarosa-isomerasa, a diferencia de lo reportado por la bibliografía, se ha comprobado que no presenta una selectividad absoluta de sustrato ya que, además de la sacarosa, es capaz de isomerizar la leucrosa y la isomaltulosa. Tras los resultados obtenidos pudo concluirse que el enlace glicosídico (1→3) de la turanosa y la glucosa terminal de la isomaltosa impidieron su isomerización.

ABSTRACT

Uncommon carbohydrates, also called "rare", are present in limited quantities in nature and are considered compounds of high interest due to their possible applications, highlighting their role as a substitute for the traditional sugars sucrose and glucose. Due to their sweetening capacity and low-calorie content, some of them possess functional properties of interest and could be considered within the so-called second-generation sweeteners, which by their nature are allowed and are totally safe for use in food.

There are various methodologies for obtaining these "rare" carbohydrates from the common ones, present in high amounts in by-products of the agri-food industry, and may play an important role in the use of agricultural waste. These methodologies include the use of enzymes belonging to the group of isomerases (EC 5), which are very powerful and safe catalysts. This work has focused on the study of the substrate specificity of two enzymes that catalyze a functional structural isomeric reaction, a commercial glucose-isomerase (EC 5.3.1.5) from *Streptomyces murinus* (Sweetzyme® IT Extra) that interconverts aldoses (glucose and xylose) into ketoses (fructose and xylulose) and a sucrose-isomerase (EC 5.4.99.11) from *Erwinia rhapontici* that modifies the glycosidic bond of sucrose to obtain isomaltulose.

The isomerization of different types of carbohydrates has been studied and Sweetzyme® has been found to have substrate specificity for monosaccharides, obtaining yields of less than 60%, because these are reversible reactions. In addition, the enzyme has high stereospecificity for D-glucose and D-xylose.

Regarding the substrate specificity of sucrose-isomerase, in contrast to that reported in the literature, it was found that it does not show absolute substrate selectivity since, in addition to sucrose it is capable of isomerizing leucrose and isomaltulose. Based on the results obtained, it could be concluded that the glycosidic linkage (1→3) of turanose and the terminal glucose of isomaltose prevented their isomerization.

2 INTRODUCCIÓN

2.1. LOS CARBOHIDRATOS

2.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Los carbohidratos son uno de los grupos de moléculas biológicas más importantes, están constituidos de manera general por carbono, hidrógeno y oxígeno y junto con los lípidos constituyen una de las principales fuentes energéticas, aunque también tienen funciones estructurales. Pueden clasificarse en tres grandes grupos, según el número de monómeros que lo conformen: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (Trejo y Chavarria, 2013).

Los **monosacáridos** son aquellos carbohidratos que no pueden hidrolizarse para dar lugar a unidades más pequeñas que sigan siendo carbohidratos, son también llamados azúcares simples. La gran mayoría de los monosacáridos responden a la fórmula química $C_n(H_2O)_n$ ($n=3-9$). Según el grupo funcional que presenten pueden clasificarse en aldosas y cetosas.

- Las aldosas están formadas por una cadena principal de carbono con un grupo carbonilo en el extremo terminal (R-CO-H), es decir, presentan un grupo aldehído, que es el grupo funcional más oxidado de la molécula, y en cada uno de los átomos de carbono intermedios de la cadena se encuentran unidos grupos hidroxilo. El número mínimo de carbonos es tres y corresponde al compuesto gliceraldehído. La aldosa más abundante es la glucosa (Nelson *et al.* 2014, Trejo y Chavarria, 2013).
- Las cetosas están constituidas por una cadena principal de carbono con un grupo carbonilo unido a dos radicales que pueden ser iguales o diferentes (R-CO-R'), es decir, presentan un grupo cetona, este grupo es el grupo funcional más oxidado que presentan. La cetosa más simple es aquella que contiene tres átomos de carbono en su cadena principal, la dihidroxiacetona (Nelson *et al.*, 2014, Trejo y Chavarria, 2013).

La **isomería** es una de las características más importantes que poseen los carbohidratos y se define como “la propiedad que presentan aquellos compuestos con la misma fórmula molecular pero que poseen distintas estructuras químicas por lo que da lugar a distintas configuraciones con distintas propiedades”. Entre aldosas y cetosas existe la **isomería estructural funcional**, es el caso de la aldosa glucosa y su isómero fructosa, una cetosa (Trejo y Chavarria, 2013).

En la estructura básica de la molécula de una aldosa o de una cetosa se encuentran carbonos quirales o asimétricos, que están unidos a cuatro sustituyentes diferentes. Este hecho da lugar a los isómeros espaciales o **estereoisomería**, que son compuestos que tienen fórmulas moleculares idénticas y presentan la misma distribución de enlaces, pero con diferente disposición espacial de sus átomos. Cuando las estructuras son imágenes especulares, son isómeros ópticos, se denominan **enantiómeros** y se nombran igual pero con el prefijo L o D (D-glucosa, L-glucosa) (Nelson *et al.* 2014). Por el contrario, cuando dos estereoisómeros no son superponibles, se trata de **diastereoisómeros**. Un caso particular son los **epímeros**, que son diastereoisómeros que tienen una configuración diferente en uno solo de sus carbonos asimétricos, es el caso de la D-glucosa y D-manosa, epímeros en el carbono 2 (C2).

Los **disacáridos** son carbohidratos formados por la unión de dos monosacáridos mediante un enlace glicosídico, esta unión se lleva a cabo mediante una reacción de deshidratación en la que se produce la pérdida de una molécula de agua. Esta unión covalente tiene lugar entre el grupo hidroxilo de uno de los monosacáridos y el hidrógeno del carbono del grupo funcional (C1 en aldosas y C2 en cetosas). Los disacáridos, en general, tienen como fórmula química $C_{2n}(H_2O)_{2n-1}$ (Nelson *et al.*, 2014).

Los disacáridos pueden presentar isomería estructural cuando están formados por los dos mismos monómeros pero estos están unidos por distinto enlace glicosídico, es el caso, por ejemplo, de la **sacarosa** (α -D-Glc(1 \rightarrow 2)- β -Fruf), **trehalulosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 1)-D-Fru), **turanosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Fruf), **maltulosa** (α -D-Glcp(1 \rightarrow 4)-D-Fruf), **leucrosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 5)-D-Fruf), **isomaltulosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf).

Pasando a los carbohidratos más complejos, los **oligosacáridos**, son carbohidratos formados por la unión de 3-10 monosacáridos, aunque existe cierta ambigüedad con respecto al número de subunidades que los conforman. La hidrólisis de estas moléculas pueden dar lugar a monosacáridos idénticos, como es el caso de los maltooligosacáridos en los que se obtienen moléculas de glucosa, o a dos o más monosacáridos diferentes como es el caso de la rafinosa, de la que se obtiene galactosa, glucosa y fructosa. En cuanto a sus propiedades puede generalizarse lo dicho para los disacáridos, los maltooligosacáridos y los isomaltooligosacáridos son isómeros estructurales cuando su grado de polimerización (número de monómeros que lo constituyen) es el mismo.

En último lugar, con grado de polimerización mayor se encuentran los **polisacáridos**, formados por la unión de un gran número de monosacáridos, al igual que los oligosacáridos, pueden estar compuestos por el mismo tipo de monómero, denominados homopolisacáridos como el almidón y la celulosa o bien por distintos monosacáridos, denominados heteropolisacáridos, como la pectina y la hemicelulosa.

2.1.2. LOS CARBOHIDRATOS EN LA DIETA

Los carbohidratos son unas de las macromoléculas más importantes en nuestra alimentación ya que son los nutrientes que más energía nos aportan y los más abundantes en nuestra dieta. La gran mayoría se encuentran formando parte de tejidos vegetales, como en el caso de alimentos consumidos de manera general como son cereales, frutas, verduras. Entre estos carbohidratos que encontramos de manera natural en los alimentos podemos distinguir distintos tipos: azúcares simples, fácilmente asimilables que engloban los mono- y disacáridos y carbohidratos complejos principalmente polisacáridos como el almidón y la fibra, presentes en cereales, legumbres o tubérculos, y cuya digestión es muy variable según sus características estructurales (González *et al.*, 2020).

2.1.2.1. CARBOHIDRATOS BIOACTIVOS

Los carbohidratos, además de ser fuente de energía y tener funciones estructurales, presentan otras muchas actividades biológicas como ser moduladores del nivel de glucosa e insulina en sangre, participar en la disminución del colesterol en sangre, favorecer la absorción del calcio, etc.

Otra propiedad importante de algunos carbohidratos es la actividad prebiótica. Los carbohidratos prebióticos son aquellos que producen una estimulación selectiva del crecimiento y actividad de determinado género de microorganismos de la microbiota intestinal confiriendo al individuo hospedador beneficios para su salud (Roberfroid *et al.*, 2010), por ello este tipo de carbohidratos debe cumplir determinados requisitos tales como: no ser hidrolizado ni absorbido en el tracto gastrointestinal superior, ser fermentado selectivamente por la microbiota intestinal y ser capaz de inducir efectos beneficiosos para la salud (Gibson *et al.*, 2004).

A este tipo de compuestos se les atribuye numerosos beneficios sobre la salud, desde la estimulación del sistema gastrointestinal (mejora de la motilidad, prevención de diarrea y estreñimiento), regulación del peso corporal y el apetito, reducción del colesterol,

aumento de la biodisponibilidad de los minerales y la estimulación del sistema inmune (Oniszczyk *et al.*, 2021).

2.1.2.2. SUSTITUCIÓN DE CARBOHIDRATOS CALÓRICOS

La obesidad, la diabetes de tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares son importantes problemas de salud que afectan a cientos de millones de personas. Según la OMS desde el año 1975 se ha triplicado en todo el mundo las personas que padecen obesidad. En el 2016 el 39% de la población mundial adulta padecía sobrepeso y el 13% obesidad, estos datos se ven acrecentados en países denominados “desarrollados”. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), según el Informe del Consumo Alimentario en España del 2020, indica que el consumo de alimentos procesados como bollería y pastelería ha aumentado en casi un 7% con respecto al 2019, suponiendo un gasto medio por habitante de casi 32 € anuales, por otro lado, el consumo de azúcar se ha incrementado en un 17% con respecto al 2019 (MAPA, 2020).

Este contexto en el que nos encontramos, sumado a la demanda por parte de la población de alimentos “reducidos en azúcares”, “sin azúcares añadidos” o “0% azúcares” ha hecho que la industria alimentaria desarrolle nuevas metodologías y reformule sus productos, reduciendo o eliminando carbohidratos calóricos como son la glucosa o la sacarosa, sustituyéndolos por edulcorantes artificiales no-calóricos como el acesulfamo-K, sacarina o polialcoholes (xilitol, sorbitol, maltitol...). Sin embargo, otra estrategia puede ser el uso de azúcares funcionales bajos en calorías, con bajo índice glucémico y buenas propiedades tecnofuncionales, como pueden ser la isomaltulosa o palatinosa, tagatosa y otros “azúcares raros” o poco abundantes, que pueden presentar además propiedades bioactivas de interés. La **Tabla I1** muestra el poder edulcorante, índice glucémico y poder calórico de la glucosa y fructosa así como de distintos edulcorantes alternativos a la sacarosa.

Tabla II. Tabla comparativa del poder edulcorante (valor de referencia de la sacarosa, 1) y el índice glicémico (valor de referencia de la glucosa, 100) de distintos compuestos empleados por la industria alimentaria como endulzantes.

NOMBRE	PODER EDULCORANTE	ÍNDICE GLUCÉMICO	REFERENCIA
MONOSACÁRIDOS			
Tagatosa	0,9	7,5	(Holub <i>et al.</i> , 2010; Bober & Nair, 2019)
Glucosa	0,7	100	(Holub <i>et al.</i> , 2010)
Fructosa	1	20	(Esquivel-Solís <i>et al.</i> , 2007)
DISACÁRIDOS			
Isomaltulosa	0,4-0,5	0-40	(Holub <i>et al.</i> , 2010, Sokolowska <i>et al.</i> , 2021)
Lactosa	0,3-0,5	40-55	(Sokolowska <i>et al.</i> , 2021)
Maltosa	0,4-0,5	>70	(Sokolowska <i>et al.</i> , 2021)
Trehalosa	0,45	>70	(Sokolowska <i>et al.</i> , 2021)
POLIALCOHOLES			
Sorbitol	0,5-1	7	(Atkinson <i>et al.</i> , 2008; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)
Maltitol	1	3	(Atkinson <i>et al.</i> , 2008; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)
Xilitol	1	8	(Atkinson <i>et al.</i> , 2008; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)
EDULCORANTES			
Aspartamo	160-220	0	(Angarita-Dávila <i>et al.</i> , 2017; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)
Acesulfamato K	200	0	(Angarita-Dávila <i>et al.</i> , 2017; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)
Sacarina	300	0	(Angarita-Dávila <i>et al.</i> , 2017; García-Almeida <i>et al.</i> , 2013)

Por tanto, la continua búsqueda de productos saludables por parte del consumidor, sumado a las nuevas metodologías empleadas por la industria alimentaria ligadas a la química verde y aprovechamiento de subproductos agroalimentarios ha centrado la atención de fabricantes e investigadores en la obtención de nuevos ingredientes para la formulación de los nuevos productos.

2.2. AZÚCARES RAROS Y SU OBTENCIÓN POR ISOMERIZACIÓN

Los azúcares raros son definidos como "monosacáridos y sus derivados que están presentes en cantidades limitadas en la naturaleza" (Van Laar *et al.* 2021). Este hecho hace necesario el empleo de distintas metodologías de extracción o síntesis, purificación o concentración de los mismos para poder ser empleados por la industria alimentaria como ingredientes en la reformulación de productos.

Los polisacáridos son fuentes de varias aldosas y 2-cetosas, pero siete son los monosacáridos que predominan: D-glucosa, D-fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-manosa y D-galactosa, considerándose sus enantiómeros y sus isómeros estructurales como azúcares raros. Algunos de ellos presentan propiedades fisiológicas interesantes como L-xilosa, empleado como precursor en la síntesis de antibióticos (Chevrier *et al.*, 2006) o L-fructosa, edulcorante no calórico para pacientes que padecen trastornos de

metabolismo de carbohidratos (Li *et al.*, 2019). La **Tabla I2** recoge algunos carbohidratos raros y sus posibles usos.

Tabla I2. Carbohidratos denominados “raros” y su uso en la industria. Fuente: Cervantes (2021).

Carbohidrato	Características	Referencia
D – Alosa	Posee actividad anticancerígena, antitumoral, antiinflamatoria, antihipertensiva e inmunosupresora	(Lim y Oh, 2011)
D – Ribulosa	Posee actividad antineoplásica, antiviral y antitumoral	(Iqbal <i>et al.</i> , 2019)
D – Tagatosa	Menor índice glucémico y calórico que la sacarosa, posee actividad antihiper glucémica.	(Bober y Nair, 2019)
L – Fructosa	Edulcorante para pacientes con enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. Inhibidor de glicosidasas.	(Franke <i>et al.</i> , 2003; Li <i>et al.</i> , 2019)
L – Glucosa	Agente empleado para la preparación de colonoscopias.	(Martínez <i>et al.</i> , 2014)
L - Xylosa	Algunos derivados actúan como inhibidores de la reabsorción urinaria de glucosa.	(Singh <i>et al.</i> , 2014)

La isomerización es una de las metodologías más empleadas para la obtención de estos carbohidratos “raros”, que presentan un gran potencial para la industria alimentaria y farmacéutica, a partir de otros más abundantes (Li *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2016). Además, se trata de una metodología muy adecuada para el aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentaria. Las reacciones de isomerización de carbohidratos pueden darse por dos vías: enzimática y química.

2.2.1. ISOMERIZACIÓN ENZIMÁTICA

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica, son estructuras capaces de acelerar las reacciones que tienen lugar tanto en el reino vegetal y animal como en microorganismos. Numerosas enzimas pueden desarrollar su función fuera del organismo productor, por ello, en la actualidad son ampliamente empleadas para la producción de alimentos, ingredientes alimentarios y fármacos. Entre las características que poseen las enzimas caben destacar (McDonald *et al.*, 2015).

- 1) Su acción es específica, tanto para la reacción que catalizan como para el sustrato al que se une, bien es cierto que determinadas enzimas pueden unirse en distinta medida a otros compuestos que no son su sustrato de actuación pero cuya estructura es semejante. Pero de manera general las enzimas poseen gran especificidad por su sustrato.
- 2) Factores de reacción muy elevados, que permiten acelerar reacciones que sin el enzima apenas se producirían.

- 3) Condiciones suaves de reacción, que no generan metabolitos tóxicos siendo normalmente sus productos aptos para el consumo y hacen que los procesos enzimáticos sean más sostenibles energéticamente.

Por todas estas ventajas tanto la industria como la investigación han centrado su mira en el empleo de las enzimas para el desarrollo de su actividad. Dada la gran variedad y especificidad de las enzimas y las reacciones que catalizan, la *Enzyme Commission* (EC) estableció una nomenclatura en función del grupo al que pertenecen, precedido por las letras EC, seguidas de cuatro dígitos separados por puntos. El primero de los dígitos indica a cuál de las seis categorías pertenece, el segundo a la subclase dentro de ese grupo y el tercero y cuarto dígito son referidos a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción (Mc Donald *et al.*, 2015). Las seis clases de enzimas son (Novozymes 2017):

EC 1. Oxidorreductasas: catalizan reacciones redox que implican transferencia de electrones. Un ejemplo son las deshidrogenasas capaces de eliminar átomos de hidrógeno de un sustrato.

EC 2. Transferasas: estas enzimas transfieren átomos de una posición a otra o incluso de una molécula a otra. Las glicosiltransferasas son capaces de transferir los residuos de glucosa dentro de un mismo polisacárido.

EC 3. Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis, es decir, ruptura de los sustratos mediante adición de moléculas de agua. Las carbohidrasas son capaces de romper enlaces glicosídicos de carbohidratos.

EC 4. Liasas: catalizan la formación de dobles enlaces o la adición de moléculas a dobles enlaces. Las pectato-liasas capaces de romper los enlaces glicosídicos de pectinas dejando libre un residuo de ácido galacturónico con un doble enlace.

EC 5. Isomerasas: que catalizan la reacción de reordenamiento de átomos dentro de una misma molécula. La glucosa isomerasa capaz de convertir la glucosa en fructosa.

EC 6. Ligasas: unen moléculas mediante enlaces covalentes. Este tipo de reacciones requieren un aporte de energía mediado por la continua hidrólisis del enlace difosfato del ATP.

Las reacciones enzimáticas son una de las principales vías para la producción de carbohidratos raros. Con este fin, entre las clases de enzimas destacan las

oxidorreductasas y las isomerasas (McDonald *et al.*, 2015). Las oxidorreductasas (EC 1.1.1.1), alcohol deshidrogenasas, ampliamente distribuidas en la naturaleza, catalizan el intercambio de electrones entre alcoholes y aldehídos o cetonas (Xu, 2005). Por otra parte, las isomerasas (EC 5), que intervienen en la modificación de carbohidratos, pueden dividirse en tres subgrupos en función de su actividad (Cervantes, 2021):

- Epimerasas (EC 5.1.3), catalizan la reacción de inversión de un hidrógeno de uno de los lados de un carbono asimétrico, desplazándolo al lado opuesto.
- Aldo-ceto isomerasas (EC 5.3.1) que catalizan la interconversión del grupo aldosa en grupo cetosa forzando la migración del hidrógeno unido al carbono entre los carbonos C1 y C2.
- Intramolecular-transferasas (EC 5.4.99), que catalizan la transferencia de grupos diversos de una posición a otra dentro de una molécula. Dos ejemplos son la EC 5.4.99.11, la sacarosa-isomerasa o isomaltulosa sintasa y la EC 5.4.99.16 o maltosa α -D-glucosiltransferasa, que transforma la maltosa en trehalosa.

La **Figura II** muestra los tres tipos de enzimas (oxidorreductasas, epimerasas y aldo-ceto isomerasas) para la producción de carbohidratos raros.

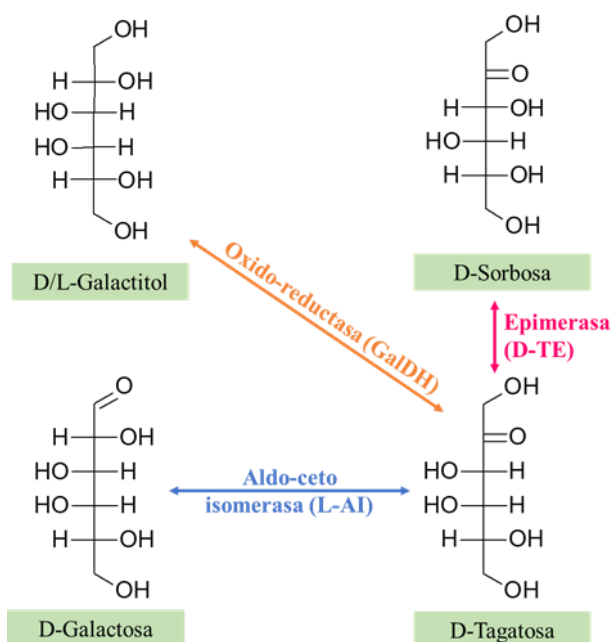


Figura II. Esquema de los tres tipos de enzimas empleadas para la producción de D-tagatosa. Galactitol-deshidrogenasa (GalDH), D-tagatosa-3-epimerasa (D-TE) y L-arabinosa-isomerasa (L-AI). Fuente: Beerens *et al.*, (2012).

Otro grupo importante de la clase de las isomerasas para la producción de carbohidratos son las intramolecular-transferasas (EC 5.4.99), que catalizan la transferencia de grupos

diversos de una posición a otra dentro de una molécula. Dos ejemplos son la EC 5.4.99.11 que es la sacarosa-isomerasa o isomaltulosa sintasa y la EC 5.4.99.16 o maltosa α -D-glucosiltransferasa, que transforma la maltosa en trehalosa. Entre las isomerasas cabe destacar, por su importante papel en la industria alimentaria, la glucosa-isomerasa, empleada generalmente para la producción de jarabe de fructosa, y la sacarosa-isomerasa empleada para la producción de isomaltulosa, edulcorante adicionado a numerosos alimentos y utilizado también en suplementos para deportistas por su bajo poder calórico.

2.2.1.1. GLUCOSA-ISOMERASA

En general, las isomerasas presentan una amplia especificidad de sustrato. Un buen ejemplo es la xilosa-isomerasa, (EC 5.3.1.5), que transforma la D-xilosa en D-xilulosa, más conocida como glucosa-isomerasa, y así la vamos a denominar en este trabajo, por su capacidad de producción de D-fructosa a partir de D-glucosa (**Figura I2**).

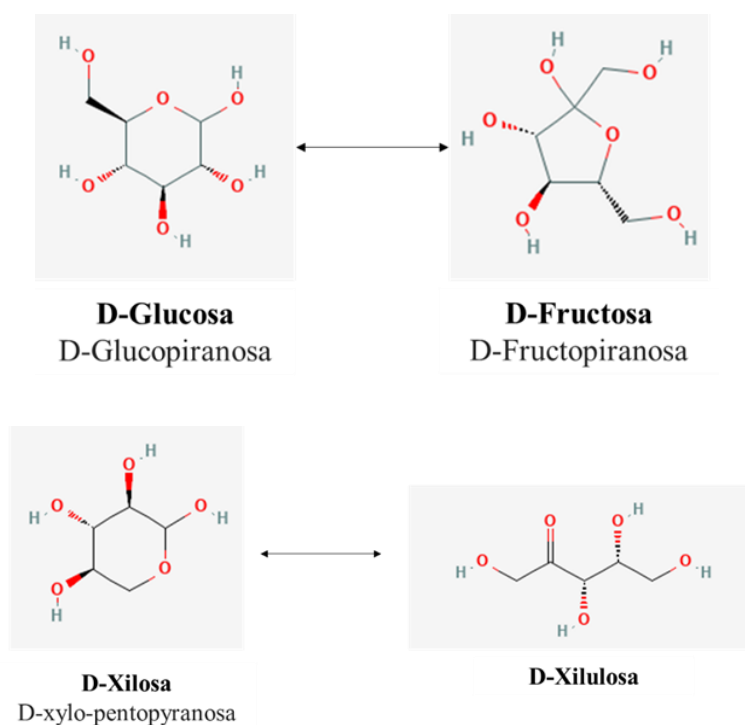


Figura I2. Proceso de isomerización de la glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5). Fuente: PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

La glucosa-isomerasa es especialmente adecuada para las aplicaciones comerciales debido a su termoestabilidad y que no requiere cofactores costosos como NAD^+ o ATP. La posibilidad de utilizar sustitutos del azúcar producidos a partir del almidón fue propuesta por Reed en 1966 y la isomerización enzimática de la glucosa a escala industrial

se llevó a cabo por primera vez en 1967 por *Clinton Corn Processing Co.* En Estados Unidos (Bhosale *et al.*, 1996).

En 1965 comenzaron a reportarse las primeras actividades de xilosa-isomerasas provenientes de *Streptomyces* sp. Se han descrito D-xilosas-isomerasas en gran cantidad de microorganismos (**Tabla I3**) cuyas especificidades de sustrato, aunque varía según el origen de la enzima, no está limitada a la D-xilosa y D-glucosa, por lo que estas enzimas pueden aplicarse en la síntesis de varias aldosas y cetosas a partir de su isómero más barato (Bhosale *et al.*, 1996).

La conversión de la D-glucosa para la obtención de su isómero D-fructosa es el proceso enzimático más empleado en la industria alimentaria con una producción de enzima del orden de 10 millones de toneladas por año (DiCosimo *et al.*, 2013). Se utiliza para la producción de alimentos y bebidas azucaradas, mejoran sus características organolépticas e higroscópicas además de reducir la viscosidad de las mezclas. La fructosa es un 75% más dulce que la sacarosa, por lo que para alcanzar el mismo grado de dulzor se necesita adicionar menor cantidad; además se absorbe más lentamente y se metaboliza sin necesidad de la intervención de la insulina, si bien su consumo excesivo puede producir problemas en el hígado donde es metabolizada (Dehkordi *et al.*, 2009).

Generalmente la fructosa se utiliza como edulcorante en forma de jarabe alto en fructosa (Neifar *et al.*, 2020). Esta mezcla ha despertado la atención de gran parte de la industria alimentaria por su sabor, poder humectante y evitar la formación de cristales de azúcar, lo que es conveniente para productos con cierta acidez como el chocolate, yogures o bebidas (White 2014). En la actualidad podemos encontrar estas enzimas en el mercado comercializadas por distintas empresas con distintos nombres comerciales, variando principalmente el organismo productor, generalmente bacterias, aunque también pueden encontrarse en levaduras. La **Tabla I3** recoge el nombre comercial, organismo que la produce y empresa que comercializa las principales glucosas-isomerasas.

Tabla I3. Principales empresas, marcas registradas y microorganismo productor de glucosa-isomerasa

Empresa distribuidora	Nombre comercial	Organismo
Gist Brocades an Anheuser-Buscg Inc.	Maxazyme®	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Novo-Nordisk	Sweetzyme®	<i>Streptomyces murinus</i>
Miles Kali-Chemie	Optisweet®	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Finnsugar	Spezyme®	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>
Reynolds Tobacco	-	<i>Arthrobacter</i> sp.
Miles Laboratories Inc	-	<i>Streptomyces olivaceus</i>

2.2.1.2. SACAROSA-ISOMERASA

La sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11), también denominada isomaltulosa-asintasa o sacarosa glucosil-mutasa, es una enzima capaz de producir isomaltulosa (**Figura I3**) y, en menores cantidades, trehalulosa, a partir de la sacarosa, pudiendo producirse además una ligera hidrólisis que da lugar a la liberación de glucosa y fructosa (Liu *et al.*, 2021a).

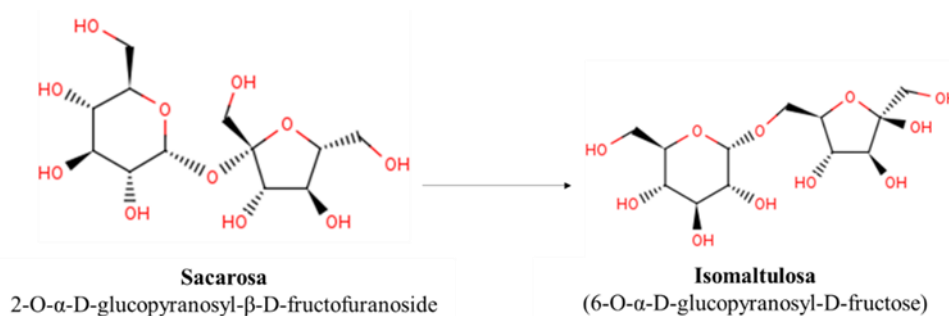


Figura I3. Proceso de isomerización de la sacarosa-isomerasa (EC 5.4.9.11). Fuente: BRENDA. <https://www.brenda-enzymes.org/>

El interés de la industria alimentaria por esta enzima reside principalmente en la producción de isomaltulosa, uno de los carbohidratos sustitutos de la sacarosa más empleados por su potencial edulcorante, no carcinogenicidad y bajo índice glucémico (Contesini *et al.*, 2012). Se ha descrito que la liberación de insulina tras el consumo de isomaltulosa se reduce comparado con otros azúcares, posibilitándose su empleo en distintos productos para diabéticos y deportistas (Contesini *et al.*, 2012; Sokołowska *et al.*, 2021). EFSA (2011) ha aprobado diferentes alegaciones de salud de la isomaltulosa, que incluyen el mantenimiento de la mineralización de los dientes y la reducción de las respuestas de la glucemia postprandial, sin aumentar desproporcionadamente las respuestas insulinémicas postprandiales, en comparación con los alimentos/bebidas que contienen sacarosa o glucosa.

Por otra parte, como se ha mencionado con anterioridad, se forma aunque en menores proporciones trehalulosa, también empleado como sustituto de la sacarosa al poseer un 70% de su poder edulcorante, ser no carcinogénico e inducir un aumento de la glucosa en sangre más lento que cuando se ingiere sacarosa (Tian *et al.*, 2019). Por tanto, la sacarosa-isomerasa, constituye una interesante herramienta para la obtención de estos carbohidratos sustitutos de los empleados en la actualidad como la glucosa, sacarosa...

La sacarosa-isomerasa está presente de manera natural en un número amplio de bacterias con capacidad glicosiltransferasa (**Tabla I4**).

Tabla I4. Principales microorganismos productores de sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11).

MICROORGANISMO PRODUCTOR	REFERENCIA
<i>Erwinia sp. D12</i>	(Kawaguti <i>et al.</i> , 2010)
<i>Serratia plymuthica</i>	(Kawaguti y Sato, 2010)
<i>Klebstella sp. K18</i>	(Orsi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Protominobactr rubrum sp.</i>	(Ravaud <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2021)
<i>Erwinia rhapontici sp.</i>	(Li <i>et al.</i> , 2011; Liu <i>et al.</i> , 2021)
<i>Serratia plymuthica sp.</i>	(Krastanov <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2021)
<i>Enterobacter sp.</i>	(Cho <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2021)
<i>Klebsiella sp.</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2021)
<i>Pantoea dispersa sp.</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas mesoacidophila sp.</i>	(Miyata <i>et al.</i> , 1992)
<i>Agobacterium radiobacter sp.</i>	(Nagai-Miyata <i>et al.</i> , 1993)

2.2.2. ISOMERIZACIÓN QUÍMICA

A pesar de que la isomerización enzimática presenta grandes ventajas, no solo por los rendimientos que se obtienen sino por las condiciones en las que transcurre la reacción, existen métodos químicos y físico-químicos de isomerización. Entre ellos la más destacada es la isomerización en medio básico de los azúcares reductores, que son aquellos que tienen un grupo carbonilo libre, sin formar parte de un enlace glicosídico. Este proceso también se denomina reacción de Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein que fue descrita por primera vez en 1885 (Angyal 2001), generalmente esta reacción tiene lugar en medio básico bien sea empleando hidróxido de sodio o calcio, obteniéndose rendimientos del 20-25%. Este rendimiento puede mejorarse empleando boratos o aluminatos, que forman complejos con la cetosa, desplazando el equilibrio de la aldosa hacia la cetosa, alcanzándose rendimientos del 85% de fructosa (Delidovich *et al.*, 2016).

Entre las ventajas que presenta la isomerización química cabe destacar su bajo coste, obtención de elevados rendimientos y posibilidad de isomerizar oligosacáridos como galactooligosacáridos (Villamiel *et al.*, 2014) y celo- y xilo-oligosacáridos (XOS) (López-Revenga 2020). Pero esta metodología también tiene sus inconvenientes: las pérdidas por degradación de la muestra y la necesidad de eliminar del producto el catalizador empleado, ya que estos no son de grado alimentario (Delidovich *et al.*, 2016).

Por tanto, aunque la isomerización química es una metodología muy apropiada para la obtención de carbohidratos menos comunes en la naturaleza, las ventajas que supone el empleo de la isomerización enzimática, más respetuosa con el medio ambiente, y cuyos

productos obtenidos son aptos para el consumo, sin necesidad de procesos de purificación posteriores, hacen de esta metodología una herramienta idónea para la síntesis y modificación de carbohidratos.

3 OBJETIVOS

La demanda de nuevos ingredientes que suplan las necesidades que reclama el consumidor, sumado a la necesidad del aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentaria, en cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>), impulsan el estudio en profundidad de metodologías para la obtención de carbohidratos “raros” que puedan ser empleados como sustitutos de los azúcares calóricos utilizados tradicionalmente en alimentación y cuyo consumo debe ser reducido por recomendación directa de la Organización Mundial de la Salud.

Por ello, el **objetivo** de este trabajo ha sido el empleo de dos enzimas isomerasas, de amplia utilización, para el estudio de la especificidad de sustrato de las mismas y la identificación de los productos, principales y secundarios, formados durante las reacciones.

Para el desarrollo de este objetivo general los **objetivos parciales** han sido:

- Estudio de la reacción de la enzima glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5) de *Streptomyces murinus* inmovilizada (Sweetzyme® IT Extra):
 - Utilizando sus sustratos habituales D-glucosa y D-xilosa, así como L-arabinosa
 - Efecto de la relación enzima/sustrato
 - Estudio de la estéreo-selectividad del enzima
 - Con otros sustratos no habituales: D-ribosa, L-ramnosa, D- y L- fucosa, D-galactosa, maltosa, melibiosa, lactosa y xilooligosacáridos.
- Estudio de la reacción de la enzima sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11) de *Erwinia rhapontici* con distintos sustratos.
 - Sacarosa como sustrato habitual
 - Isómeros de sacarosa (glucosil-fructosas): leucrosa, isomaltulosa, turanosa
 - Isomaltosa (glucosil-glucosa)

Para lograr este objetivo se desarrolló un **plan de trabajo** dividido en los siguientes pasos:

ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE 2 ENZIMAS

Glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5)

Streptomyces murinus

Sustratos habituales

- D-glucosa (D-glucopiranos)
- D-xilosa (D-xylo-pentopiranos)
- L-arabinosa

1. Estudio relación enzima / sustrato
2. Estudio estereoespecificidad

Otros sustratos:

- L-ramnosa
- D-ribosa
- Disacáridos

Sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11)

Erwinia rhapontici

Sustrato habitual

- Sacarosa α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Frucf

Otros sustratos isómeros de la sacarosa

- Isomaltulosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fru)
- Leucrosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 5)-D-Fruf)
- Turanosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Fru)

- Isomaltosa (α -DGlcp-(1 \rightarrow 6)-D-Glc)

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS Y MUESTRAS

Para la realización del trabajo se han empleado los siguientes reactivos: D-Glucosa (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania), L-Glucosa, D-Xilosa, L-Xilosa, D-Arabinosa, L-Arabinosa, D-Galactosa, D-Manosa, Isomaltosa (6-O- α -D-glucopiranosil-D-glucosa), β -fenil-glucósido, hexametildisilazano (HMDS), NaH_2PO_4 , MgSO_4 , (Sigma-Aldrich St. Louis, MO), D-Ribosa (Tokio Chemical Industry, Japón), L-Fucosa, L-Ramnosa, Leucrosa (α 5-O- α -D-glucopiranosil-D-fructose), D-turanosa (3-O- α -D-glucopiranosil D-fructosa) (Carbosynth, Berkshire, UK), D-Fucosa, (Alfa Aesar, Alemania), D-lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucose), Piridina (Labkem, Barcelona, España), D-sacarosa (2-O- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranosido) (Ficher chemical, UK), ácido trifluoroacético (TFA) (Divisione Carlo Erba Reagents, Francia). El agua empleada para la preparación de las disoluciones fue de calidad ultra pura, obtenida mediante un sistema Milli-Q A 10 (Billerica, MA, EEUU).

4.2. ISOMERIZACIÓN ENZIMÁTICA

4.2.1. GLUCOSA-ISOMERASA

Sweetzyme® IT Extra (Sweetzyme) es una glucosa-isomerasa (EC 5.3.1.5) producida por la bacteria *Streptomyces murinus*, proporcionada en forma inmovilizada por Novozymes, que cataliza la reacción de interconversión de D-glucosa a D-fructosa.

Basándonos en los datos de la bibliografía (Amaral-Fonseca *et al.*, 2021) se preparó tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7, con MgSO₄ 50 mM (50 mM NaH₂PO₄ / 50 mM Na₂HPO₄ + 50 mM MgSO₄). Las soluciones de carbohidrato se prepararon con este tampón a una concentración del 30% (p/v). La relación sustrato / enzima inmovilizada fue 1 g de azúcar / 0,25 g de enzima. Al tratarse de un enzima inmovilizada y realizar las reacciones en discontinuo estas se llevaron a cabo en un baño de agua a 60 °C con agitación interna suave. Se prepararon alícuotas individuales para cada tiempo, por duplicado. Para ello se pesó el enzima en tubos eppendorf (37,5 mg) y se añadió 0,5 mL de la solución de carbohidrato. Transcurrido el tiempo de reacción, entre 15 min y 24 h, las alícuotas correspondientes eran inactivadas en baño de agua a 100°C durante 5 min y a esa mezcla de reacción se le adicionaron 200 µL de patrón interno (10 mg/mL). Esa mezcla se centrifuga 6 min a 12000 rpm y se toman 10 µL para su posterior derivatización e inyección en GC-FID. Los azúcares ensayados y los tiempos de reacción fueron (el tiempo 0 sin enzima):

- Hexosa: D-glucosa (sustrato): 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3 horas. Enantiómero L-glucosa 24 horas. L-Ramnosa: 0,5; 2, 4 y 24 horas.
- Pentosas: D-xilosa 2; 4; 6 y 24 horas. D-Xilosa ([enzima / sustrato] x3): 0,5; 1; 2; 4 y 24 horas. Enantiómero L-xilosa: 24 horas. L-Arabinosa: 1, 4, 6 y 24 horas. L-Arabinosa ([enzima / sustrato] x3): 0,5; 1; 2; 4 y 24 horas. Enantiómero D-arabinosa 0; 2; 4; 6 y 24 horas.
- Otras hexosas D-manosa, D-galactosa; disacáridos: melibiosa, maltosa, lactosa. Xilooligosacáridos (XOS), toma de alícuota a 24 horas.

4.2.2. SACAROSA-ISOMERASA

La otra enzima ensayada fue una sacarosa-isomerasa (EC 5.4.99.11) producida por la bacteria *Erwinia rhapontici* proporcionada por Nzytech Genes & Enzymes. Las condiciones de reacción se basaron en las especificadas por el fabricante e indicadas en la bibliografía (Li *et al.*, 2011) utilizando un tampón fosfato sódico 50 mM a pH 5, con

MgSO₄ 50 mM (50 mM NaH₂PO₄ / 50 mM Na₂HPO₄ + 50 mM MgSO₄). Los azúcares ensayados se prepararon a una concentración del 20% (p/v). La relación sustrato / enzima fue 1 g de azúcar / 0,5 mL de enzima (concentración de proteína según fabricante 1 mg/mL). Al tratarse de un enzima soluble las reacciones se realizaron en tubos eppendorf, por duplicado, se incubaron a 30 °C en thermomixer (Eppendorf) y se tomaron alícuotas de 10 µL a los tiempos correspondientes, entre 0,5 y 24 h (el tiempo 0 sin enzima), para sacarosa e isomaltulosa. Los otros carbohidratos (turanosa, leucrosa, isomaltosa) se ensayaron a tiempos únicos de 24 horas. Las muestras se inactivaron 5 min en agua en ebullición.

Para el análisis por GC-FID a 10 µL de la mezcla de reacción se le adicionaron 400 µL de patrón interno β-fenil glucósido (0,5 mg/mL) y del volumen total se tomaron 200 µL para su preparación para el posterior análisis.

4.3. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS, GC-FID

Todas las muestras preparadas fueron analizadas mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID). Para analizar las muestras de carbohidratos por GC es necesario realizar una modificación química, una derivatización. Con esta modificación se busca sustituir los grupos polares por apolares, lo que se consigue con esto es disminuir la temperatura de evaporación del compuesto a analizar y posibilitar su análisis mediante GC (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Esta derivatización consiste en la sustitución de los grupos hidroxilo de los carbohidratos por grupos trimetilsilil-.

En el caso de los carbohidratos reductores como la glucosa, la presencia de un carbono anomérico libre da lugar a la aparición de formas tautoméricas lo que da lugar a cromatogramas complejos. Por ello y para la simplificación de los mismos se lleva a cabo una previa etapa de oximación que tiene como finalidad el bloqueo del centro anomérico del azúcar, por medio de una reacción de condensación entre la hidroxilamina con el grupo aldehído o cetona. Como resultado de esta reacción, los azúcares reductores forman dos isómeros diferentes (syn- y anty- o E y Z), que presentan una relación isomérica fija para cada azúcar dando lugar a dos picos en el cromatograma.

Para la cuantificación de los carbohidratos presentes en cada una de las muestras, éstas se llevaron a sequedad en un concentrador a temperatura ambiente. Para formar las trimetilsilil oximas (TMSO) (derivados de los carbohidratos para su análisis por CG), se añadieron a las muestras 250 µL de cloruro de hidroxilamina al 2,5% en piridina, se agitó

enérgicamente y se mantuvieron durante 30 minutos a 70 °C con una agitación intermedia. Posteriormente tiene lugar una reacción de sililación añadiendo 250 µL de HDMS y 25 µL de TFA para favorecer la reacción que debe producirse en medio ácido. La mezcla se mantuvo a 50 °C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 10.000 rpm y se recogió el sobrenadante que se conservó a 4 °C hasta su análisis. El análisis de carbohidratos se llevó a cabo mediante GC-FID empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 7820A Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EEUU). Se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-5HT, con fase ligada (5% fenilmetilpolisiloxano, Agilent J&W, Folsom, California, USA) con las siguientes características: 30 m x 0,250 mm x 0,10 µm. La temperatura del inyector fue de 280 °C y la del detector 385 °C. Se empleó como gas portador el nitrógeno con flujo de 1 mL/min. El programa de temperatura varió en función de la muestra a analizar:

- Muestras de pentosas: temperatura inicial 120 °C, rampa de 3 °C/min hasta 270 °C.
- Muestras de hexosas y disacáridos: temperatura inicial 150 °C, rampa de 3 °C/min hasta 270 °C.
- Muestras de XOS: temperatura inicial 120 °C, rampa de 3 °C/min hasta 380 °C.

La adquisición y el tratamiento de los datos se llevaron a cabo utilizando el software Agilent ChemStation (Wilmington, DE, EEUU). La cuantificación de los resultados obtenidos se hizo mediante el método de patrón interno (β -fenil-glucósido) por medio del cálculo de los factores de respuesta (FR). Para ello se emplearon distintos patrones en concentración variable desde 2 hasta 0,0015 mg/mL de los siguientes carbohidratos: xilosa, glucosa, sacarosa y rafinosa. Para el cálculo de los factores de respuesta a partir de los datos obtenidos del calibrado, se empleó la siguiente fórmula:

$$FR = \frac{mg \text{ Carbohidrato} * \text{Área patrón interno}}{\text{Área azúcar} * mg \text{ patrón interno}}$$

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. GLUCOSA-ISOMERASA (EC 5.3.1.5). ESTUDIO SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

5.1.1. PROCESO DE ISOMERIZACIÓN DE LA D-GLUCOSA

Con el objeto de estudiar el proceso de isomerización de distintos azúcares con la enzima comercial Sweetzyme, la forma inmovilizada de la glucosa-isomerasa producida por *S. murinus*, en primer lugar se ensayó su actividad sobre D-glucosa, sustrato principal de dicha enzima, en las condiciones adecuadas según la casa comercial Novozymes, a distintos tiempos para poder comprobar su correcto funcionamiento y extrapolar las condiciones a los siguientes carbohidratos estudiados, de forma que la reacción con la D-glucosa pudiera servir de referencia.

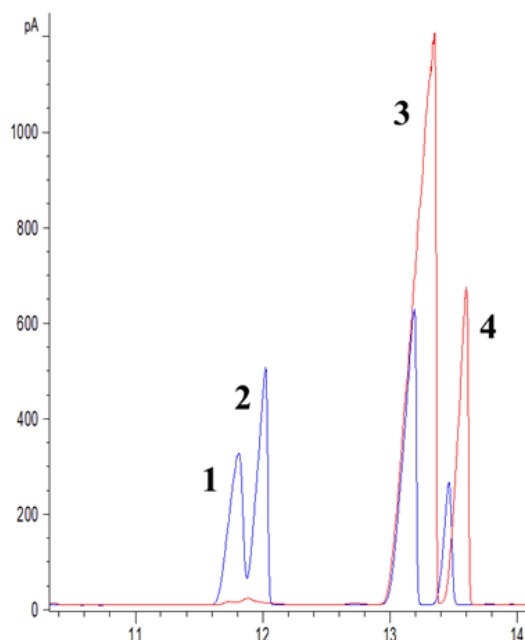


Figura R1. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la D-glucosa con Sweetzyme[®] IT Extra, pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-glucosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 3 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) D-fructosa, (3 y 4) D-glucosa.

Los resultados obtenidos tras la isomerización (**Figura R1**) con la glucosa-isomerasa analizados mediante GC-FID determinan que la isomerización fue efectiva, formándose gran cantidad de fructosa (picos 1 y 2) a partir de la glucosa (picos 3 y 4).

La **Figura R2** muestra los resultados obtenidos tras la isomerización a 3 h. El porcentaje máximo de fructosa obtenido fue del 55,8%, entre los 45 min y 1,5 h, siendo éste un rendimiento bastante elevado, bien es cierto que a partir de ese punto el rendimiento de reacción disminuye mínimamente, debido a que se alcanza el equilibrio de la reacción. Bhosale *et al.* (1996) indicó que se produce un claro efecto de la temperatura sobre la

producción de D-fructosa, entre 25 °C (43,5%) y 90 °C (55,6%), incrementándose un 12,1%. Sin embargo, al tratarse de una interconversión se alcanza un límite de equilibrio, poco variable (Amaral-Fonseca *et al.*, 2021), aun con enzimas recombinantes (Jin *et al.*, 2021).

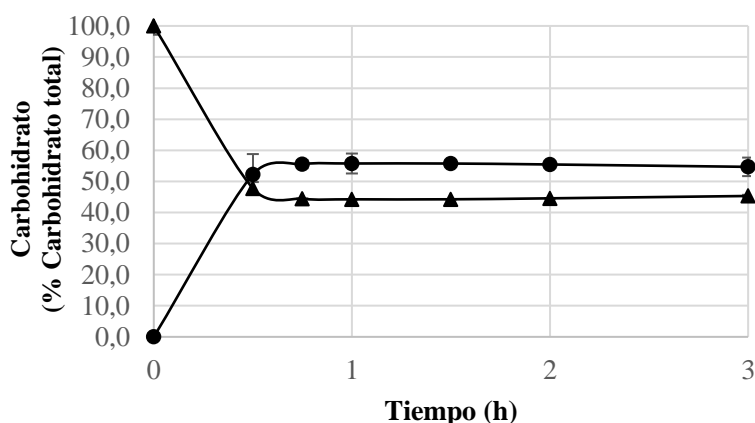


Figura R2. Cinética de isomerización de la D-glucosa (0,3 g/mL) empleando Sweetzyme[®] IT Extra (40 IGIU/g) en tampón 0,05 M NaH_2PO_4 + $MgSO_4$, pH 7, 60°C: (▲) glucosa (%); (●) fructosa (%).

Tras el estudio del enzima con su sustrato de referencia se decidió que para el estudio de la especificidad de sustrato con los carbohidratos restantes las condiciones de ensayo serían las mismas, es decir 60 °C con agitación interna suave, para facilitar el contacto entre el enzima inmovilizada y el sustrato, a un pH de 7, una concentración de carbohidrato del 30%, relación sustrato/enzima 1g / 0,25 g y un tiempo máximo de 24 h, para comprobar si se producía o no reacción.

- ISOMERIZACIÓN DE LA L-GLUCOSA

Para comprobar si afectaba la conformación de la D-glucosa y L-glucosa (**Figura R3**) a la interacción enzima/sustrato y, por tanto, a la reacción de isomerización, tras obtener rendimientos superiores al 50% de D-fructosa, se decidió probar la actividad de la Sweetzyme con L-glucosa. Esta reacción resultaría de interés ya que la L-fructosa ya que además de edulcorante para pacientes con enfermedades relacionadas con el metabolismo de la glucosa, es inhibidor de glicosidasas e incluso es empleado como insecticida para moscas y hormigas (Franke *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2019).

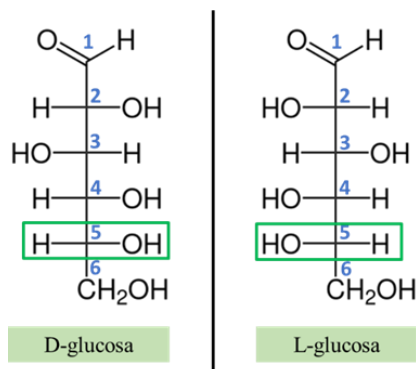


Figura R3. Proyección de Fischer D-glucosa y L-glucosa. Fuente: Adaptado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fischer_projection_of_D-_and_L-Glucose.svg

La **Figura R3** muestra las dos posibles proyecciones de Fischer de los enantiómeros de la glucosa. Esta representación surge a finales del siglo XIX como método común para designar las posibles configuraciones de los monosacáridos. Para designar la posición L- o D- es necesario recurrir al carbono asimétrico (posee cuatro sustituyentes diferentes) más alejado con respecto al grupo funcional, un grupo aldehído en el ejemplo de la glucosa. En este ejemplo, el carbono asimétrico más alejado es el que se encuentra en la posición C5, por tanto, designaremos como configuración L- a aquella molécula que posea el grupo hidroxilo del C5 en el lado izquierdo y en contraposición será designada como D-glucosa la que lo tenga en el lado derecho.

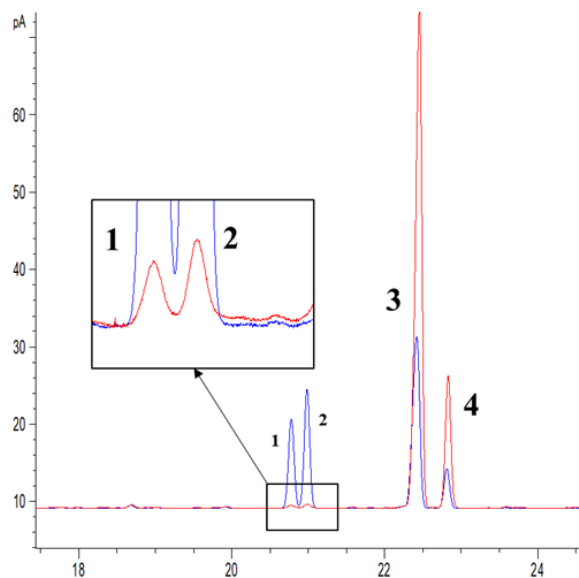


Figura R4. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de L-glucosa (rojo) y D-glucosa (azul) con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de glucosa y 0,075 g/mL de enzima, a las 24 horas. Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa.

La **Figura R4** muestra los perfiles cromatográficos de los ensayos con L-glucosa y D-glucosa, en las mismas condiciones tras 24 h de reacción. Como puede observarse la isomerización de L-glucosa en L-fructosa es mínima, apenas del 1,5% considerándose

poco más que trazas, por tanto, se puede concluir que Sweetzyme presenta una muy alta especificidad para la forma D-glucosa. Jokela *et al.* (2002) indicaron este mismo comportamiento con una xilosa-isomerasa de *Streptomyces rubiginosus*.

5.1.2. ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE PENTOSAS

Para estudiar la especificidad enzima / sustrato, se decidió probar la isomerización con distintos monosacáridos comenzando por las pentosas, xilosa, arabinosa y ribosa.

La xilosa es el sustrato natural de este enzima en los organismos vivos. En la página web de referencia BRENDA (*The Comprehensive Information System*) esta enzima aparece anotada como EC 5.3.1.5 xilosa-isomerasa y como sinónimo glucosa-isomerasa. Hay que considerar que este enzima está presente en numerosos microorganismos ya que la interconversión de la xilosa en xilulosa es un requisito nutricional en las bacterias saprofitas que crecen sobre el material vegetal en descomposición ya que es la xilulosa la que puede ser metabolizada. El residuo de pentulosa es fosforilado por una xiluloquiinasa para producir D-xilulosa-5-fosfato, que es metabolizada a través de la ruta de Embden-Meyerhoff (Bhosale *et al.*, 1996).

5.1.2.1. PROCESO DE ISOMERIZACIÓN DE LA D-XILOSA

La D-xilosa es una aldopentosa presente de manera natural en numerosos tejidos vegetales, como uno de los componentes principales de la hemicelulosa. Su isómero, la D-xilulosa, es una cetopentosa que raramente se encuentra de manera natural (Beerens *et al.*, 2012). La D-xilulosa es comúnmente empleada como fuente energética, materia prima para la obtención de pentosas ramificadas por la industria farmacéutica (Beerens *et al.*, 2012), inhibidor de glicosidasas e intermediario en diversas rutas metabólicas (Meng *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

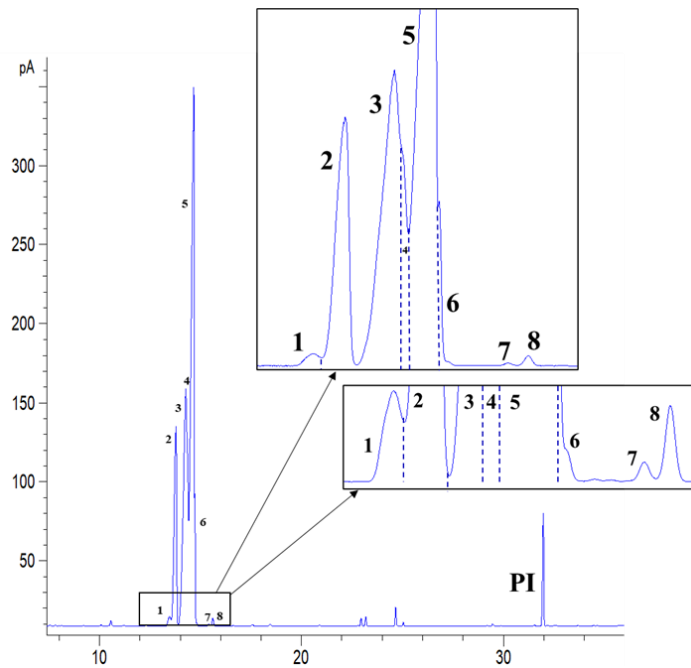


Figura R5. Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la isomerización de D-xilosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL D-xilosa y 0,075 g/mL de enzima, tras 24 horas de reacción. Picos identificados: (2 y 4) D-xilulosa, (3 y 5) D-xilosa, (7 y 8) D-ribosa. Picos (1 y 6) tentativamente D-lixosa.

La **Figura R5** muestra un cromatograma representativo correspondiente a la isomerización con glucosa-isomerasa de la D-xilosa. Además de la D-xilulosa (picos 2 y 4) puede detectarse la formación tras 24 h de reacción de otra pentosa, la ribosa (picos 7 y 8), un epímero en C3 de la D-xilosa y los picos 1 y 6 pueden corresponder a otra pentosa, la D-lixosa, epímero en el C4 de la D-xilosa (**Figura R6**), Este hecho debe ser confirmado cuando se disponga del patrón adecuado.

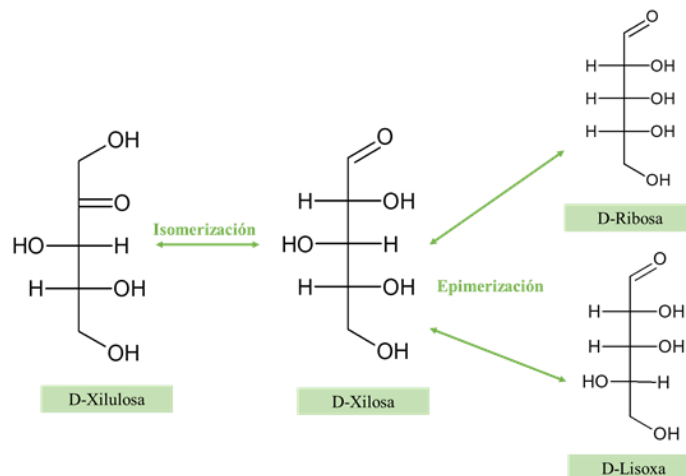


Figura R6. Esquema reacción de isomerización y epimerización de la D-Xilosa.

Vuolanto *et al.* (2002) indicaron que la xilosa-isomerasa de *S. rubiginosus* es capaz de formar epímeros, aunque su eficacia es mucho menor que en la formación de isómeros.

Delidovich *et al.* (2016) indicaron que durante la isomerización de las aldosas catalizadas por bases a través del anión enediol puede formarse la cetosa correspondiente (xilulosa) y su epímero (ribosa). Estudios previos de nuestro grupo reportaron la formación de ribosa al isomerizar xilosa con aluminato de sodio como catalizador (López-Revenga, 2020).

La **Tabla R1** recoge los resultados obtenidos del proceso de isomerización de la D-xilosa, al emplear glucosa-isomerasa. Puede observarse que el porcentaje de isomerización es máximo entre las 6 y 24 h (23%), también a las 24 h es máxima la formación de la D-ribosa (0,6%).

Tabla R1. Datos obtenidos de la isomerización de D-xilosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme[®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	D-lixosa*	D-xilulosa	D-xilosa	D-ribosa
0	0	0	100	0
2	1,3 \pm 0,0	17,5 \pm 1,3	81,1 \pm 1,3	0,1 \pm 0,0
4	1,1 \pm 0,1	18,8 \pm 0,3	80,1 \pm 0,4	0,1 \pm 0,0
6	0,9 \pm 0,1	22,6 \pm 1,2	76,5 \pm 1,3	0,1 \pm 0,0
24	2,3 \pm 0,1	23,2 \pm 1,1	73,8 \pm 1,2	0,6 \pm 0,1

Tras este ensayo, y dado que quedaba un 73,8% de xilosa sin reaccionar, se decidió realizar un segundo ensayo empleando el triple de enzima y manteniendo las demás condiciones iniciales. La **Tabla R2** muestra los rendimientos obtenidos al emplear esas condiciones, obteniéndose rendimientos más elevados a menores tiempos de reacción. Cabe destacar que el rendimiento de L-xilulosa (**Tabla R1** y **Tabla R3**) aumentó ligeramente al modificar las condiciones enzima / sustrato, alcanzando un máximo del 29,7% al cabo de 4 horas, disminuyendo a las 24 horas por formación de otros compuestos, posiblemente lixosa (11%). Adney *et al.* (2009) obtuvieron resultados semejantes, 23,8% de D-xilulosa, al emplear Sweetzyme inmovilizada en pellets a un pH de 7,5 y 34 °C, con la adición de borato 0,05 M, sin embargo, la adición de esta sal hacía necesario un paso posterior de purificación de los carbohidratos.

Tabla R2. Datos obtenidos de la isomerización de D-xilosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme[®] IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M NaH₂PO₄ + MgSO₄, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media ± desviación estándar).

Tiempo (h)	D-lixosa*	D-xilulosa	D-xilosa	D-ribosa
0	0	0	100	0
0.5	0,4 ± 0,03	24,7 ± 0,9	74,9 ± 0,9	0 ± 0
1	0,4 ± 0,1	25,0 ± 0,2	74,6 ± 0,1	0 ± 0
2	1,4 ± 0,3	27,1 ± 0,2	71,5 ± 0,4	0 ± 0
4	1,9 ± 0,2	29,7 ± 0,3	68,4 ± 0,5	0 ± 0
24	11,0 ± 0,2	23,8 ± 0,7	64,7 ± 0,9	0,5 ± 0,01

Gogar *et al.* (2021) han indicado recientemente la limitación del enzima glucosa-isomerasa para la interconversión de glucosa y xilosa en sus correspondientes cetozúcares fructosa y xilulosa, con rendimientos de equilibrio de ~50 y ~20%, respectivamente. Olivier *et al.* (1986) encontraron resultados semejantes, si bien la glucosa-isomerasa de *S. griseofuscus* mostraba mayor actividad frente a la D-xilosa que a la D-glucosa, la cantidad de D-xilulosa formada era considerablemente menor que de D-fructosa. Gogar *et al.* (2021) observaron que sólo es posible mejorar dichos rendimientos si se superan las limitaciones del equilibrio de estas reacciones reversibles mediante la isomerización y extracción simultánea del producto formado mediante reacción con ácido bórico y otros reactivos.

La baja formación de ambas pentosas, D-ribosa y D-lixosa recogido en la **Tabla R1**, coincide con los datos reportados por Delidovich *et al.*, (2018) que obtuvo un rendimiento del 1% de ribosa al emplear tampón fosfato sódico 0,5 M pH 7,5 a 78 °C durante 3,6 h. En cambio, esta metodología aportó rendimientos muy bajos para la D-xilulosa (6%). López-Revenga, (2020) obtuvo datos semejantes (D-xilosa 93,7%, D-xilulosa 4,2%, pérdida de azúcares 2,1%) al emplear aluminato como catalizador (relación molar aluminato 0,7/1 D-xilosa; 40 °C, 4 horas). Mejores resultados se obtuvieron con el empleo de condiciones subcríticas. Gao *et al.*, (2015) obtuvo un 35% de D-xilulosa empleando etanol acuoso al 80% en condiciones subcríticas (180°C). Posteriormente Gao *et al.*, (2017) obtuvo un 43% al emplear acetonitrilo al 60% a 180°C durante 500 s. Por tanto, esta metodología para la isomerización de la D-xilosa en D-xilulosa puede ser de gran interés, aunque la isomerización con glucosa-isomerasa, es también una buena opción al obtenerse un rendimiento del 29% empleando temperaturas que no conllevarían un gasto energético tan elevado.

- ISOMERIZACIÓN DE LA L-XILOSA

Al igual que el ensayo realizado con L-glucosa se decidió estudiar la reacción de isomerización de la L-xilosa. La L-xilulosa es un carbohidrato empleado como materia prima para la producción de L-xilosa, inhibidor de glicosidasas e intermediario de numerosas vías metabólicas (Meng *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

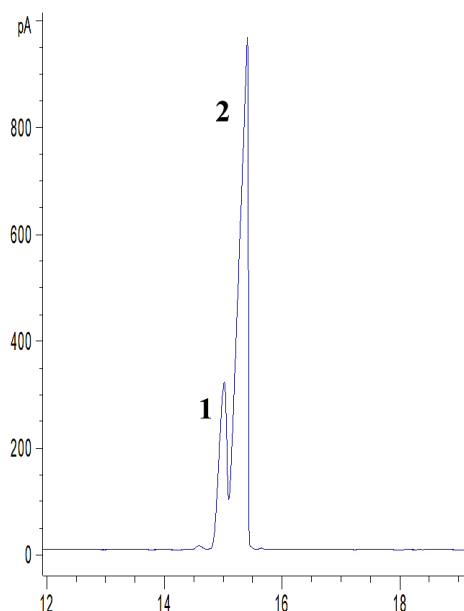


Figura R7. Perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de la reacción de isomerización de la L-xilosa con Sweetzyme ® IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-xilosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 24 horas. Picos identificados: (1 y 2) L-xilosa.

Como se puede observar en la **Figura R7** que muestra la reacción de la glucosa-isomerasa con la L-xilosa a las 24 horas, no se produce isomerización, detectándose poco más que trazas de L-xilulosa (0,5%). Por tanto, y como ocurre para la L-glucosa, la enzima presenta especificidad para uno de los enantiómeros. Olivier *et al.* (1986) para la glucosa-isomerasa de *S. griseofuscus* y Jokela *et al.* (2002) con la de *S. rubiginosus* indicaron esta misma enantioselectividad para la D-glucosa y D-xilosa.

5.1.2.2. ISOMERIZACIÓN DE LA L-ARABINOSA

La L-ribulosa, isómero de la arabinosa, se obtiene de manera general por medio de la isomerización enzimática y química de la L-arabinosa, forma natural de este monosacárido, aunque puede obtenerse también por medio de la isomerización de la L-ribosa. La L-ribulosa presenta mayor interés que la forma D- al poder emplearse en la industria farmacéutica para la producción de fármacos, como antibióticos y antivirales como la Neplanocina (bloqueante de la maduración viral). Además de actuar como intermediario en la producción de L-ribosa a partir de L-ribulosa (Liu *et al.*, 2019). Según

el esquema general de Langan *et al.* (2014) y Delidovich *et al.*, (2016) por isomerización de la L-arabinosa se forma L-ribulosa y por epimerización L-ribosa.

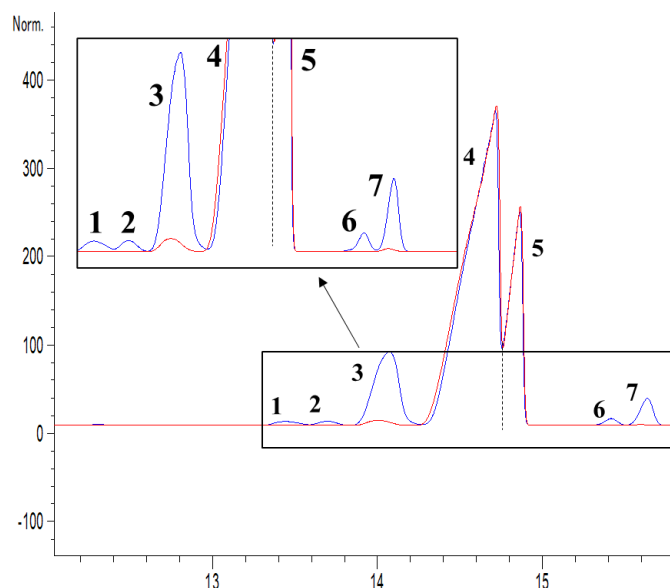


Figura R8. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la L-arabinosa con Sweetzyme a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-arabinosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul) Picos identificados: (3) L-ribulosa, (4 y 5) L-arabinosa, (6 y 7) L-ribosa. Picos (1 y 2) pentosa no identificada.

En el perfil cromatográfico de la muestra isomerizada (**Figura R8**) se muestran los picos 1 y 2 correspondientes a una pentosa no identificada, el pico 3 corresponde al pico mayoritario de la L-ribulosa, el 4 está constituido por el segundo pico de la ribulosa y arabinosa que coeluyen, el pico 5 corresponde al segundo de la arabinosa y por último los picos 6 y 7 corresponden a la L-ribosa. Como se ha mencionado, el pico 4 está constituido por ribulosa y arabinosa, para su cuantificación se decidió tomar el pico 4 exclusivamente como arabinosa, asumiendo, por tanto, que la cuantificación de ribulosa se realiza ligeramente por defecto y la de arabinosa por exceso. En la **Tabla R3** se puede ver que el rendimiento cuantificado de la isomerización es máximo a las 24 horas (11,6%), aunque en realidad este porcentaje es algo mayor.

Tabla R3. Datos obtenidos de la isomerización de L-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme[®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	L-pentosa	L-ribulosa	L-arabinosa	L-ribosa
0	0	0	100	0
1	0,2 \pm 0,1	3,8 \pm 0,5	91,7 \pm 9,2	0,4 \pm 0,1
4	0,4 \pm 0,0	5,5 \pm 0,1	87,0 \pm 1,9	0,6 \pm 0,0
6	0,5 \pm 0,1	8,2 \pm 1,5	91,4 \pm 1,9	0,9 \pm 0,0
24	1,3 \pm 0,3	11,6 \pm 2,3	84,3 \pm 9,0	2,7 \pm 0,8

Como en el ensayo con xilosa, se realizó el estudio de la isomerización de la L-arabinosa con mayor concentración de enzima. Como se observa en la **Tabla R4** el rendimiento máximo de L-ribulosa se consigue a las 24 horas en ambos ensayos (11,6% y 9,5% respectivamente) y la evolución a lo largo del tiempo es prácticamente idéntica. Por tanto el aumento de la relación enzima/sustrato no resulta adecuado.

Tabla R4. Datos obtenidos de la isomerización de L-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme ® IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	L-pentosa	L-ribulosa	L-arabinosa	L-ribosa
0	0	0	100	0
0,5	0,1 \pm 0,0	3,2 \pm 0,7	96,5 \pm 11,4	0,2 \pm 0,0
1	0,2 \pm 0,0	4,4 \pm 0,1	95,2 \pm 1,4	0,3 \pm 0,0
2	0,2 \pm 0,0	6,5 \pm 0,2	92,8 \pm 1,6	0,5 \pm 0,0
4	0,4 \pm 0,0	7,8 \pm 0,5	91,0 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1
24	1,1 \pm 0,2	9,5 \pm 2,1	73,0 \pm 15,7	3,2 \pm 0,5

Aunque para el desarrollo industrial de procesos con enzimas inmovilizadas se deben utilizar reactores en columnas, la realización de este tipo de ensayos en discontinuo nos pueden dar una buena idea de la mayor o menor influencia de la velocidad de paso de la solución de carbohidrato por la columna y de la relación de carga de enzima de la columna y la concentración de sustrato que pasa. Así vemos que, por una parte, en el caso de la xilosa y la arabinosa se trata de reacciones lentas, por lo que el tiempo de residencia del carbohidrato en la columna debe ser elevado. Pero, por otra parte, parece que para mejorar el rendimiento de D-xilulosa se precisa una elevada relación carga enzimática / sustrato en la columna, mientras que para el caso de la L-ribulosa este factor sería irrelevante.

- ISOMERIZACIÓN DE LA D-ARABINOSA

Como en el caso de los carbohidratos estudiados con anterioridad se decidió ensayar el enantiómero D-arabinosa, con el interés añadido de estudiar la enantioselectividad con un monosacárido cuya forma natural es la L-.

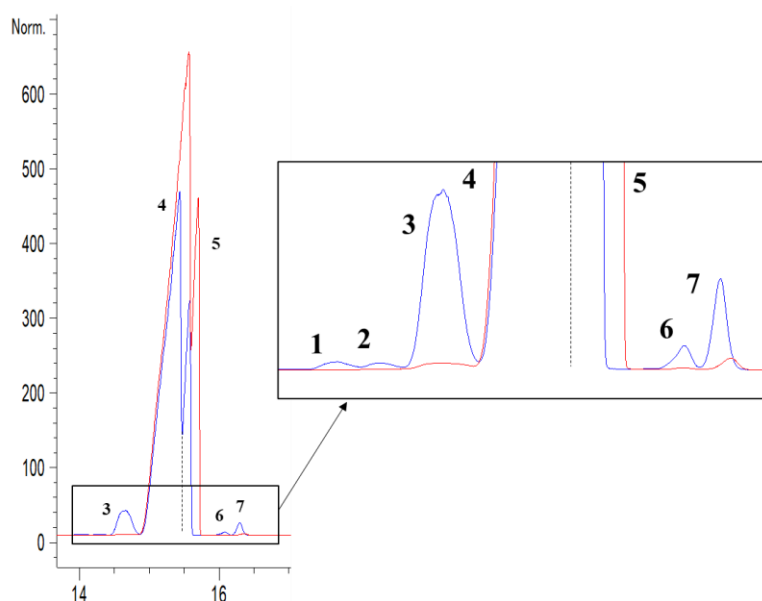


Figura R9. Perfiles cromatográficos de la isomerización de la D-arabinosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-arabinosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (3) D-ribulosa, (4 y 5) D-arabinosa, (6 y 7) D-ribosa. Picos (1 y 2) Pentosa no identificada.

En la **Figura R9** pueden observarse la formación de hasta 7 picos, cualitativamente la reacción es idéntica entre D- y L-arabinosa (Figura R.8). Como se aprecia en la **Tabla R5**, la reacción es lenta, siendo la formación del isómero D-ribulosa del mismo orden que la del epímero en C2, D-ribosa, durante las primeras 6 horas de reacción. A partir de este momento la reacción de isomerización continúa, alcanzándose la máxima cantidad de D-ribulosa a las 24 horas (4,2%), disminuyendo ligeramente la concentración de D-ribosa. Este comportamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos por Olivier y Du Toit (1986) con Sweetzyme[®] type Q; estos autores observan muy baja actividad frente a L-arabinosa y menor aun para D-arabinosa. Posteriormente, Pastinen *et al.* (1999) con la xilosa-isomerasa de *S. rubiginosus* determinan que la velocidad de reacción de este enzima frente a la D-arabinosa es de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mg}^*\text{min}$ y con la L-arabinosa 5,0 $\mu\text{g}/\text{mg}^*\text{min}$.

Tabla R5. Datos obtenidos de la isomerización de D-arabinosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme[®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	D-pentosa	D-ribulosa	D-arabinosa	D-ribosa
0	0	0	100	0
2	0 \pm 0	0,8 \pm 0,1	98,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,01
4	0 \pm 0	1,1 \pm 0,1	97,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
6	0 \pm 0	1,7 \pm 0,1	96,3 \pm 0,4	2,0 \pm 0,3
24	0,3 \pm 0,0	4,2 \pm 0,5	94,3 \pm 0,5	1,2 \pm 0,03

Por tanto, las glucosas isomerasas presentan menor enantioselectividad para la arabinosa. Esto quizás se deba al hecho de que estas enzimas, en los microorganismos de los que proceden, hayan evolucionado para adaptarse mejor a la utilización de los sustratos naturales (D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa), aunque puede que la interacción enzima-sustrato se vea favorecida, en general, con las formas D-.

En cuanto a la isomerización de la L-arabinosa, el comportamiento de las glucosa-isomerasas es muy distinto, así la de *Streptomyces griseofuscus* no presentaba actividad (Kasumi *et al.*, 1981), mientras que con el enzima de *S. rubiginosus* se obtuvieron un mayor rendimiento (24% de L-ribulosa, 2% de L-ribosa) (Pastinen *et al.*, 1999).

Es importante mencionar que en la actualidad para la producción de L-ribulosa existen otras enzimas como la L-arabinosa-isomerasa (EC 5.3.1.4) presente en algunos microorganismos como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans* o *Thermotoga maritima* (Liu *et al.*, 2019) con las que se obtienen rendimientos mayores de hasta 91%. Numerosos autores reportaron rendimientos de L-ribulosa cercanos al 30% empleando la enzima L-ribose isomerase (EC 5.3.1.B3) presente en *Cryobacterium* sp. N21 (Mahood *et al.*, 2020 a), *Mycetocola miduiensis* (Mahmood *et al.*, 2020 b), *A. fermentans* ATCC 43279 (Tseng *et al.*, 2017). Por otra parte, existen enzimas destinadas a la obtención de L-ribosa a partir de L-arabinosa, por ejemplo la L-arabinosa presente en *Acinetobacter calcoaceticus* DL-28 aportó un rendimiento de L-ribosa del 20% (Yeo *et al.*, 2021), mucho mayor al obtenido empleando Sweetzyme.

En cuanto a la isomerización química, Delidovich *et al.*, (2018) obtuvieron rendimientos de L-ribulosa del 15% y 5% para la L-ribosa, al emplear fosfatos para la isomerización de la L-arabinosa. En estudios previos realizados por López-Revenga (2020) utilizando aluminato de sodio como catalizador se obtuvieron rendimientos de L-ribulosa del 20% y 2,5% de L-ribosa (relación molar aluminato / D-arabinosa 0,7/1; 40 °C, 4 horas).

5.1.2.3. ISOMERIZACIÓN DE LA D-RIBOSA

La D-ribosa es una pentosa muy interesante desde el punto de vista farmacológico, una de las metodologías más empleadas para su producción en grandes cantidades es la fermentación (De-wulf, 1997). La isomerización de la D-ribosa da lugar a la D-ribulosa (Iqbal *et al.*, 2019) y, como se ha mencionado con anterioridad, también puede ser obtenido a partir de la D-arabinosa, aunque este sustrato es más caro. La **Figura R10**

muestra el cromatograma correspondiente a la isomerización de la D-ribosa con glucosa-isomerasa. A tiempo 24 horas se identificaron los picos de la D-ribosa (pico 6) y D-ribulosa (pico 3), los picos 4 y 5 fueron identificados como D-arabinosa y se observó la aparición de los picos 1 y 2 correspondientes a una pentosa no identificada, como ocurría con el ensayo de L- y D- arabinosa. Como se puede observar en la **Tabla R6**, el rendimiento máximo de D-ribulosa se alcanza a las 6 horas de reacción (19,5%). Como se ve, la D-ribosa es un mejor sustrato que la D-arabinosa para la obtención de D-ribulosa.

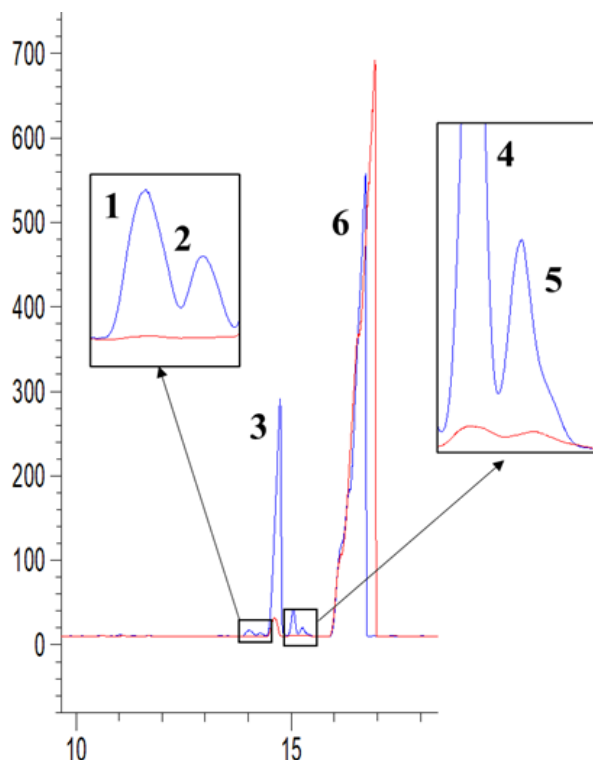


Figura R10. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la D-ribosa con Sweetzyme a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de D-ribosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (3) D-ribulosa, (4 y 5) D-arabinosa, (6) D-ribosa. Picos (1 y 2) pentosa no identificada.

La **Figura R10** muestra el cromatograma correspondiente a la isomerización de la D-ribosa con glucosa-isomerasa. A tiempo 24 horas se identificaron los picos correspondientes a la D-ribosa (pico 6) y D-ribulosa (pico 3), pero además se observó la aparición de los picos 1 y 2 correspondientes a una pentosa no identificada, como ocurría con el ensayo de L- y D- arabinosa. Tras comparar con los ensayos anteriores los picos 4 y 5 fueron identificados como D-arabinosa.

Tabla R6. Datos obtenidos de la isomerización de D-ribosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme ® IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	D-pentosa	D-ribulosa	D-arabinosa	D-ribosa
0	0	0	0	100
2	0,3 \pm 0,1	14,5 \pm 1,3	0,7 \pm 0,1	84,5 \pm 1,4
4	0,4 \pm 0,1	17,9 \pm 1,5	1,1 \pm 0,1	80,5 \pm 1,3
6	0,6 \pm 0,2	20,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,1	77,5 \pm 0,7
24	1,0 \pm 0,1	19,5 \pm 0,5	2,5 \pm 0,3	77,0 \pm 0,8

Como en casos anteriores, existen otras enzimas que pueden producir D-ribulosa. Iqbal *et al.*, (2019) con una D-arabinosa-isomerasa de *Thermanaeromonas toyohensis* obtuvieron un rendimiento del 21%, resultado muy similar al obtenido aquí empleando Sweetzyme, pero partiendo de D-arabinosa. En cuanto a la isomerización química, Gao *et al.*, (2015) obtuvo rendimientos de D-ribulosa superiores (40%) empleando etanol subcrítico tras 500 s de reacción, a partir de D-arabinosa.

5.1.3 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE HEXOSAS

Tras las pentosas estudiadas por el interés que despiertan sus isómeros en la actualidad para la industria alimentaria, farmacéutica y/o química, para ampliar el estudio sobre la especificidad de sustratos, se decidió realizar ensayos de isomerización con Sweetzyme y algunas hexosas. Como se ha visto el sustrato más adecuado de esta enzima es la glucosa. Las otras hexosas ensayadas en reacciones de 24 horas fueron: L-ramnosa (6-deoxy-L-mannose), L-fucosa (6-deoxy-L-galactose), D-fucosa (6-deoxy-D-galactose), D-manosa y D-galactosa.

- ISOMERIZACIÓN DE LA L-RAMNOSA

Según se pudo comprobar a 24 h utilizando L-rhamnosa como sustrato se producía cierta isomerización, por lo que se decidió estudiar puntos intermedios de la reacción. La **Figura R 11** representa el perfil cromatográfico de la misma. Según se aprecia es semejante al perfil de la glucosa, mucho más simple que el de las pentosas. En él se aprecia la formación de L-rhamnulosa (picos 1 y 2) a partir de L-rhamnosa (picos 3 y 4). Como se puede ver el rendimiento de L-rhamnulosa fue del 12,2%, a las 24 h de reacción (**Tabla R8**).

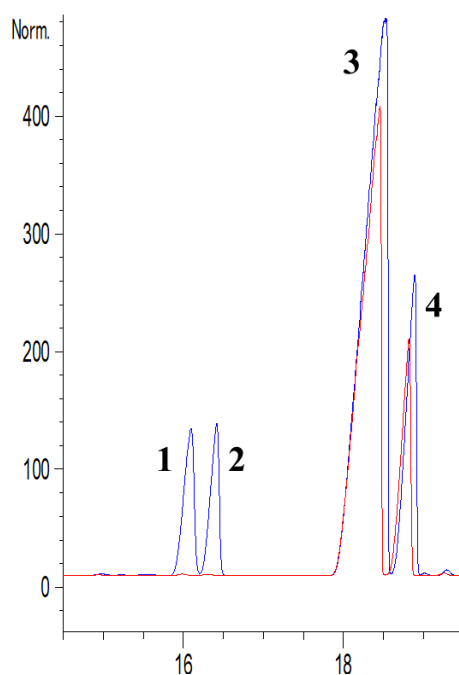


Figura R11. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de la L-ramnosa con Sweetzyme[®] IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de L-ramnosa y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 3 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) L-ramnulosa, (3 y 4) L-ramnosa.

Tabla R7. Datos obtenidos de la isomerización de L-ramnosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme[®] IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Tiempo (h)	L-Ramnulosa	L-Ramnosa
0	0	100
0.5	3,9 \pm 0,2	96,1 \pm 0,2
2	7,4 \pm 1,2	92,6 \pm 1,2
4	9,0 \pm 1,6	91,0 \pm 1,6
24	12,2 \pm 0,4	87,8 \pm 0,4

Kim *et al.* (2018) utilizó Sweetzyme en un reactor de lecho compacto para producir L-ramnulosa. En las condiciones óptimas (pH 8,0, 60 °C, 300 g/L de L-rhamnosa) alcanzó una conversión del 45%. Generalmente, para la obtención de L-ramnulosa (6-deoxi-L-sorbosa) se ha empleado la L-ramnosa-isomerasa, también empleada para la obtención de otros carbohidratos como son la L-fructosa a partir de L-manosa, D-psicosa de D-alosa, D-sorbosa a partir D-gulosa y D-ribulosa a partir de D-ribosa (Bhuiyan *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2019).

La L-ramnulosa (6-deoxi-L-sorbosa), como otros L-azúcares se utilizan como precursores esenciales en la preparación de muchos compuestos valiosos. La L-ramnulosa es un precursor del furaneol (2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona), una sustancia aromatizante para alimentos parecida al caramelo (Hecquet *et al.*, 1996).

- ISOMERIZACIÓN DE LA D-GALACTOSA

Dado que la D-tagatosa es el epímero C-4 de la D-fructosa, y la D-galactosa es el epímero C-4 de la D-glucosa y la glucosa es fácilmente convertida en fructosa por Sweetzyme, se decidió ensayar esta enzima con la D-galactosa para formar D-tagatosa. Este monosacárido es uno de los carbohidratos que mayor interés ha despertado tanto para la industria como para investigación (Sokołowska, *et al.*, 2021), es un carbohidrato de muy bajo índice glucémico y calórico y promueve la salud intestinal (Bober y Nair, 2019). Desde el punto de vista tecno-funcional es un ingrediente muy demandado, que se emplea en la industria farmacéutica, cosmética, química y alimentaria como edulcorante (Sokołowska, *et al.*, 2021; Cheetham y Wootton 1993).

La **Figura R12** muestra el cromatograma obtenido tras la isomerización de la galactosa. Los picos 5 y 6 corresponden a la D-galactosa, que da lugar a cantidades mínimas de D-tagatosa (picos 1 y 2) y de una hexosa no identificada (picos 3 y 4), posiblemente talosa, epímero en C2 de la galactosa (Delidovich *et al.*, 2016).

La isomerización dio lugar a un rendimiento de D-tagatosa mínimo (1%) a las 24 h por lo que se decidió no continuar con el ensayo (**Tabla R8**). Con este mismo tipo de enzima Cheetham y Wootton (1993) no detectaron formación alguna de tagatosa. En la actualidad, se emplean L-arabinosa-isomerasas para la producción de D-tagatosa (Ravikumar *et al.*, 2021).

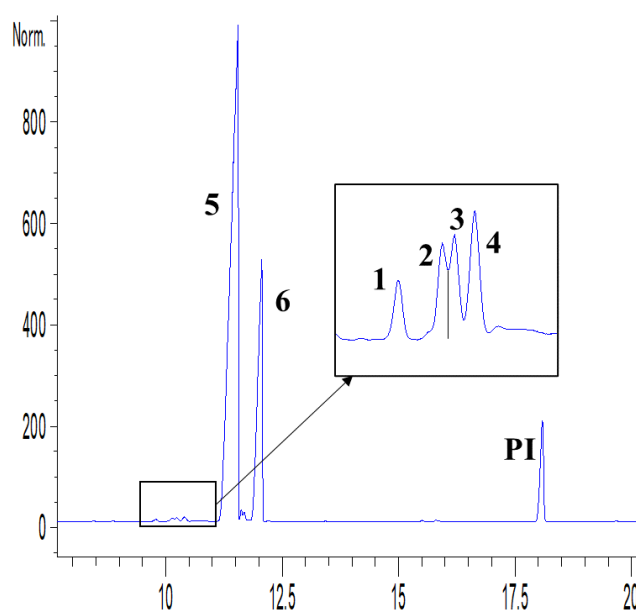


Figura R12. Cromatograma obtenido del análisis por GC-FID de la isomerización de la D-galactosa con glucosa-isomerasa a tiempo 4 horas. Picos: (1,2) D-tagatosa, (3,4) posible talosa, (5,6) D-galactosa.

Tabla R8. Datos obtenidos de la isomerización de L-fucosa (0,3 g/mL) D-fucosa (0,3 g/mL), D-manosa (0,3 g/mL) y D-galactosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme ® IT Extra (0,225 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar). D-fucosa no se realizaron duplicados.

Carbohidrato a las 24 horas		
D-galactosa	D-tagatosa	D-galactosa
	0,9 \pm 0,1	99,1 \pm 0,1
L-fucosa	L-fuculosa	L-fucosa
	0,2 \pm 0,01	99,8 \pm 0,01
D-fucosa	D-Fuculosa	D-fucosa
	0,3	99,7
D-manosa	D-fructosa	D-manosa
	2,2 \pm 0,1	97,8 \pm 0,1

En los procesos de isomerización química se utiliza el hidróxido de calcio como catalizador. López-Revenge (2020) en ensayos con aluminato de sodio obtuvo rendimientos de D-tagatosa del 15,8%. En cuanto a las otras hexosas (D- y L-fucosa y D-manosa) no se obtuvo isomerización, alcanzándose poco más que sólo cantidades traza de isómero a las 24 horas (**Tabla R8**).

5.1.4 ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE DISACÁRIDOS

Tras los resultados obtenidos para diversos monosacáridos tanto hexosas como pentosas, se decidió ensayar bajo las mismas condiciones distintos disacáridos por el interés que despiertan sus posibles isómeros en la industria alimentaria y por la distinta naturaleza de su estructura, aunque todos tenían una molécula de glucosa en su extremo reductor. Los disacáridos ensayados fueron: maltosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp) y melibiosa (α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glcp). La **Tabla R9** muestra el resultado obtenido de las isomerizaciones a las 24 horas de reacción.

Tabla R9. Datos obtenidos de la isomerización de maltosa (0,3 g/mL), lactosa (0,3 g/mL) y melibiosa (0,3 g/mL), empleando Sweetzyme ® IT Extra (0,075 g/mL) en tampón 0,05 M $NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 7, a 60 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Carbohidrato a las 3h		
Maltosa	Maltulosa	Maltosa
	0,7 \pm 0,1	98,4 \pm 0,1
Lactosa	Lactulosa	Lactosa
	3,1 \pm 0,03	95,0 \pm 0,1
Melibiosa	Melibiulosa	Melibiosa
	1,8 \pm 0,02	96,5 \pm 0,05

Como se observa en la **Tabla R9** los resultados para la isomerización de disacáridos no son buenos, el rendimiento máximo obtenido para la lactosa fue de un de 3,1% de lactulosa. Ni siquiera la maltosa, constituida por 2 glucosas, presenta cierta isomerización. Por último, para determinar si este enzima presenta actividad frente a disacáridos de pentosas, se ensayó una mezcla de XOS comerciales (**Figura R13**) que contenía una elevada concentración de xilobiosa (pico 10 y 11), comprobando igualmente que no se producía isomerización de este disacárido, mientras que la pequeña cantidad de xilosa y glucosa presente sí se isomerizaba de forma eficiente (**Figura R13**). Por tanto, se puede indicar que este enzima presenta una especificidad absoluta para monosacáridos.

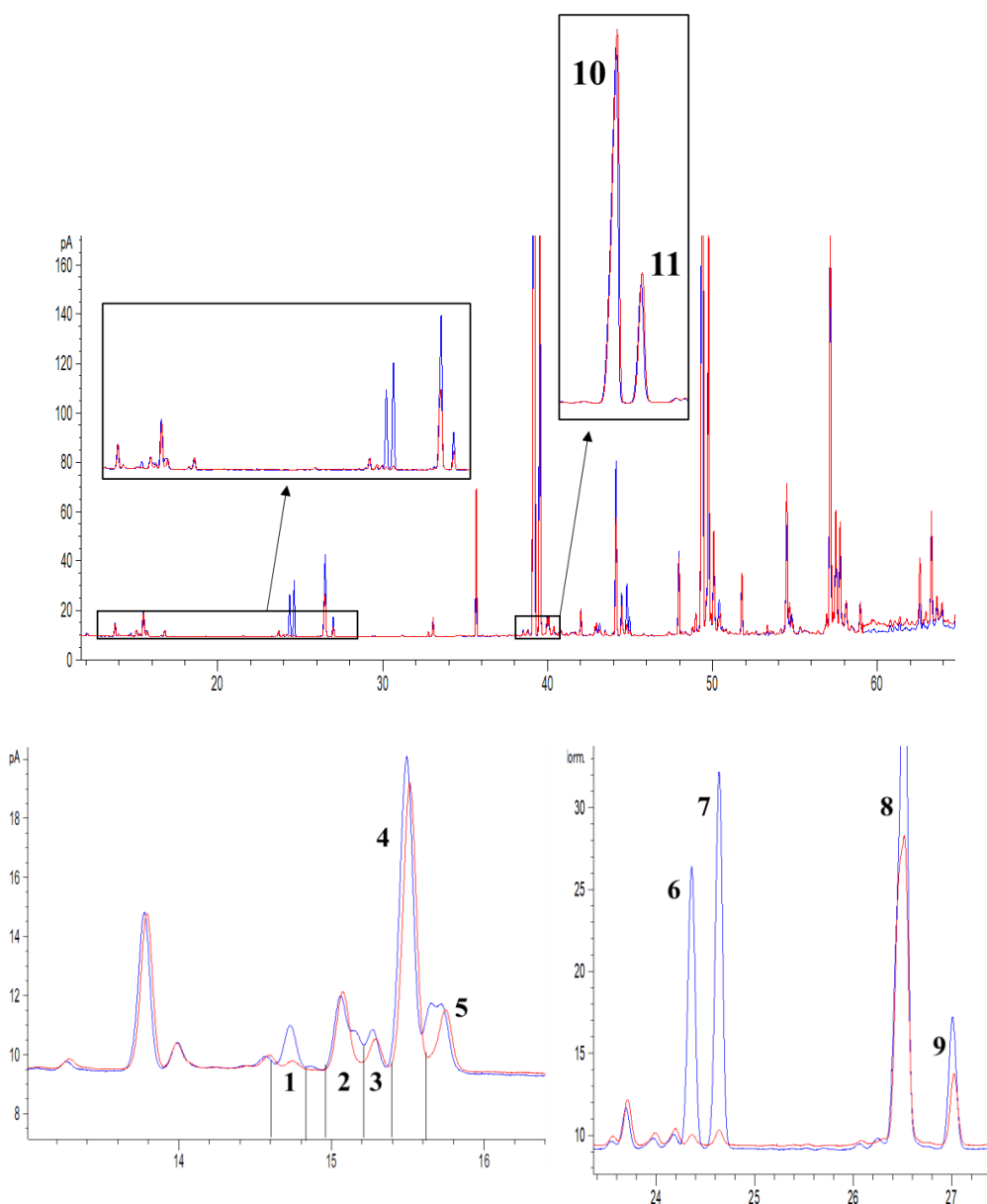


Figura R13. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de la isomerización de xilooligosacáridos (XOS) con Sweetzyme® IT Extra a pH 6, 60 °C; 0,3 g/mL de XOS y 0,075 g/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). a) Picos identificados: (10 y 11) Xilobiosa. b y c) (1 y 3) xilulosa, (2 y 4) xilosa, (6 y 7) fructosa, (8 y 9) glucosa. Pico (5) pentosa no identificada.

En el caso de los disacáridos existen otras metodologías para su isomerización. En el caso de la lactulosa, generalmente es obtenida a partir de la lactosa presente en el permeado de suero de quesería por medio de isomerización en medio básico, aunque también pueden emplearse β -galactosidasas (Villamiel *et al.*, 2014). Mayer *et al.*, (2004) obtuvieron un rendimiento de lactulosa del 44% al emplear β -galactosidasa de *Pyrococcus furiosu* a pH 5, una temperatura de 75 °C, y como sustrato 34 g/L de lactosa y 270 g/L de fructosa.

Para el caso de la maltosa y la melibiosa, en un estudio previo López-Revenga (2020) al emplear aluminato de sodio (40 °C, carbohidrato al 20%, y aluminato 0,7 g/g carbohidrato) para la isomerización de ambos disacáridos mostraron rendimientos de maltulosa del 90% a las 6 h de reacción y de melibiulosa del 51%, ambos con pérdidas por degradación muy bajas. En cuanto a la obtención de lactulosa, Sabater *et al.* (2017), mediante isomerización de permeado de suero concentrado (200 g/L de lactosa) utilizando borato sódico como catalizador (relación molar boro/lactosa, 1/1; pH 12; 70 °C, 30 min) obtuvo un rendimiento del 78%.

Por último, Sweetzyme tampoco era apropiada para la isomerización de los XOS, únicamente isomerizándose los monosacáridos presentes. En estudios previos realizados por López-Revenga (2020) utilizando aluminato de sodio como catalizador (relación molar aluminato 0,7/1; XOS; 40 °C, 4 horas) se obtuvieron rendimientos de isomerización de los XOS del 21%.

5.2 SACAROSA-ISOMERASA (EC 5.4.99.11): ESTUDIO SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

5.2.1 ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE LA SACAROSA

La sacarosa isomerasa es una enzima perteneciente al grupo de las isomerasas que, como se ha dicho, cataliza la reacción de transformación de la sacarosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)-D-Fruf) en isomaltulosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf) y en menor medida en trehalulosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 1)-D-Fruf) (**Figura R14**). Por tanto, la sacarosa-isomerasa no es una isomerasa que actúe sobre el grupo funcional como Sweetzyme sino sobre los enlaces, modificándolos, se trata, por tanto de otro tipo de isomería estructural.

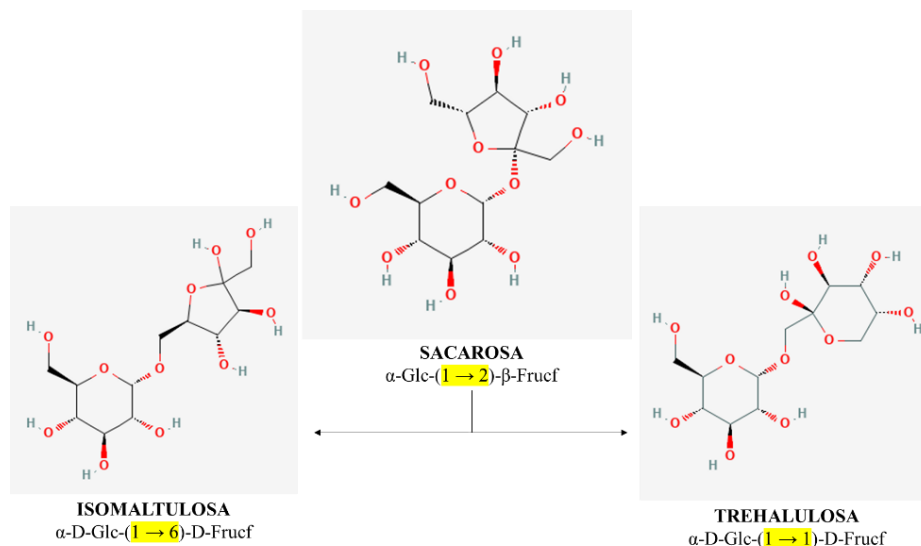


Figura R14. Representación del proceso de isomerización de la sacarosa-isomerasa a partir de la sacarosa.

A continuación, la **Figura R15** muestra los cromatogramas de la reacción de la sacarosa isomerasa con su sustrato, la sacarosa. En el caso de la isomerización de la sacarosa (pico 7) se produce la ruptura del enlace (1 \rightarrow 2) y la glucosa que forma parte del complejo enzima-sustrato se une a la fructosa formando preferiblemente un enlace (1 \rightarrow 6), isomaltulosa (picos 12 y 13) o palatinosa, y en menor proporción formando un enlace (1 \rightarrow 1) correspondiente a la trehalulosa.

Estos cambios de enlace es muy posible que se establezcan sin una liberación de la fructosa al medio. Además, puede observarse la aparición de los picos correspondientes a la isomaltosa (picos 14 y 15), aunque en muy pequeña cantidad.

En este caso es otra molécula de glucosa la que actuaría de aceptor. Esto sería posible ya que se observa cierta hidrólisis de los disacáridos que dan lugar a la fructosa (picos 1 y 2) y glucosa (picos 3 y 4). Además, se observó la formación de dos compuestos no identificados (picos 5 y 6), cuya naturaleza puede ser semejante al β -fenil-glucósido y que alcanzaron la máxima formación a las 24 horas. Esta reacción, salvo la formación de isomaltosa, ha sido descrita por otros autores (Cheetham *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 2021b).

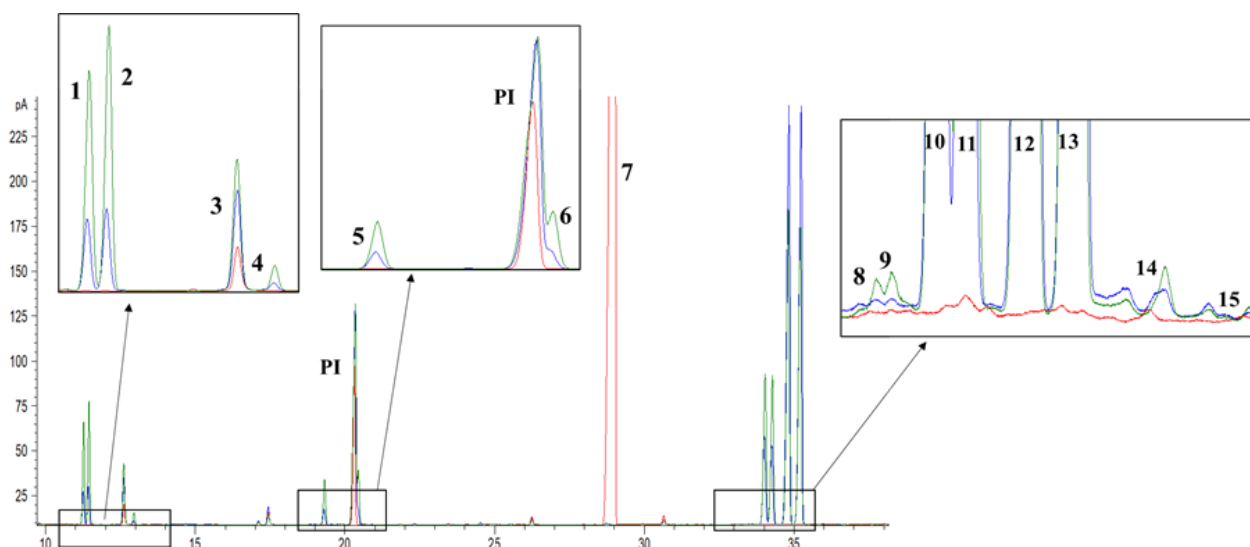


Figura R15. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la sacarosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de sacarosa y 10^{-3} mg/mL de enzima a tiempo 0 (rojo), 0,5 (azul) y 24 horas (verde). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (7) sacarosa, (8 y 9) leucrosa, (10 y 11) trehalulosa, (12 y 13) isomaltulosa, y (14 y 15) isomaltosa. Picos (5 y 6) compuestos no identificados.

La **Tabla R10** muestra la evolución de la reacción de la sacarosa con sacarosa isomerasa. Como puede observarse la reacción transcurre rápidamente, alcanzando una transformación de la sacarosa total (0,2% de sacarosa residual). Al ser este el primer punto de nuestro análisis resulta necesario hacer un estudio a tiempo más cortos que permita ver una verdadera evolución de la sacarosa. En cuanto a la formación de isomaltulosa es máxima a los 30 minutos (80,5%).

En este caso y viendo su evolución posterior es de suponer que ese valor esté muy próximo al máximo. En este punto la formación de trehalulosa es la menor (14,8%), mientras la mayor es a las 24 horas de reacción (26,7%). A partir de los 30 min de reacción se puede considerar que es la isomaltulosa la que actúa como sustrato, decreciendo por formación de trehalulosa y por la hidrólisis que se produce para dar lugar, curiosamente, a mucha mayor cantidad de fructosa (9,3%) que de glucosa (2,5%), aunque los tres disacáridos presentes en la reacción están compuestos por una molécula de fructosa y otra de glucosa.

Tabla R10. Datos obtenidos de la isomerización de sacarosa (0,2 g/mL), empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($NaH_2PO_4 + MgSO_4$), pH 5, a 30 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar). A tiempo 6 horas no se obtuvieron duplicados.

Tiempo (h)	Fructosa	Glucosa	Pico 5	Pico 6	Sacarosa	Trehalulosa	Isomaltulosa	Isomaltosa
0	0	0	0	0	100	0	0	0
0.5	2,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	14,8 \pm 0,2	80,5 \pm 0,0	0 \pm 0
0.75	2,8 \pm 1,4	1,2 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	0,2 \pm 0,0	16,6 \pm 0,3	78,3 \pm 2,5	0 \pm 0
1	3,4 \pm 1,2	1,2 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	17,3 \pm 0,4	76,8 \pm 0,9	0 \pm 0
2	3,3 \pm 0,4	1,2 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0	20,2 \pm 0,1	73,7 \pm 0,5	0,2 \pm 0,02
4	6,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0	21,7 \pm 0,2	67,8 \pm 0,5	0,2 \pm 0,01
6	4,7	1,9	1,3	2,7	0,1	26,7	64,0	0,3
24	9,3 \pm 0,8	2,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	3,3 \pm 0,4	0,1 \pm 0,0	26,7 \pm 0,2	57,9 \pm 0,2	0,3 \pm 0,03

Liu *et al.*, (2021a) en un artículo de revisión sobre la obtención de isomaltulosa compara sacarosa-isomerasa de distinto origen y los rendimientos obtenidos, incluyendo la producción a partir de *E. rhapsontici* NX-5 (66 kDa), misma enzima de nuestro estudio. Dicho artículo describió un rendimiento del 87% de isomaltulosa, al emplear 30 °C, pH 5. Así mismo, recoge rendimientos más elevados de hasta el 91% al emplear sacarosa-isomerasa de *Pantoea dispersa* UQ68J, a un pH de 5 y 30-35 °C (Wu y Birch, 2005).

Por otra parte, en la actualidad existen gran variedad de microorganismos a los que se les ha modificado parte de su genoma para aumentar la producción de algún enzima, es el caso de la sacarosa isomerasa proveniente de *S. plymuthica* D398G/V465E y Y219L/V465E, ambas alcanzaban un rendimiento en la producción de isomaltulosa de 94,7% (Pilak *et al.*, 2020). Sin embargo, al tratarse de reacciones con tan alto rendimiento es difícil obtener ventajas importantes por este medio.

La inmovilización del enzima sacarosa-isomerasa puede ser de mayor interés. En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias para la obtención de elevados rendimientos de isomaltulosa por inmovilización enzimas o de células microbianas, sobre todo de *E. rhapsontici*, *Erwinia sp* y *S. plymuthica*. Krastanov *et al.* (2006) empleando sacarosa-isomerasa de *S. plymuthica* ATCC15928, inmovilizada sobre una retícula de quitosano con glutaraldehído, obtuvieron un rendimiento del 94% de isomaltulosa. Posteriormente estos autores al emplear la misma enzima inmovilizada en una membrana de fibra hueca obtuvieron un rendimiento de isomaltulosa del 90% (Krastanov *et al.*, 2007). Estos rendimientos son semejantes a los obtenidos a partir de enzima y la inmovilización presenta grandes ventajas, entre ellas, procesamiento mínimo, reutilización de la propia enzima y mejora en la estabilidad (Liu *et al.*, 2021a).

Otro aspecto importante a considerar en este enzima es que la reacción es esencialmente irreversible, quedando apenas sacarosa en el medio, a diferencia de las reacciones de la glucosa-isomerasa en las que se establece un equilibrio aldosa/cetosa. Cheetham (1984) indica también que la isomaltulosa va convirtiéndose lentamente en trehalulosa, como hemos podido observar en la reacción aquí llevada a cabo (**Tabla R10**).

La especificidad de sustrato de este enzima ha sido tratada por distintos autores. Cheetham (1984) en un primer trabajo sobre este enzima indica su absoluta especificidad hacia la sacarosa, ya que ensaya maltosa, lactosa, rafinosa, galactosa, arabinosa y manosa, solos o en combinación con sacarosa sin mostrar reactividad. Sin embargo, Kakinuma *et al.* (1996) lograron sintetizar derivados de la sacarosa sustituida en su molécula de fructosa con distintos radicales (metilo, cloruro, amino, sulfhidrilo...) obteniendo hasta un 43% de producto. Para la sacarosa isomerasa de *Serratia plymuthica*, Véronèse y Perlot (1998) establecen su mecanismo de actuación en el que la enzima (E) se une a un primer sustrato (sacarosa), libera un primer producto (fructosa) y produce una segunda forma enzimática (E-Glucosa) que se une a un segundo sustrato, preferiblemente fructosa, pero que también puede ser H₂O, para la liberación de glucosa y fructosa, o glucosa para la producción de isomaltosa, como hemos podido detectar en nuestras reacciones, aunque la cantidad formada de isomaltosa es mínima. En un estudio posterior Lee *et al.* (2008) produjeron isomaltosa con un rendimiento del 45% mediante la mutación dirigida de la sacarosa isomerasa de *Protaminobacter rubrum*.

5.2.2 ESTUDIO DE LA ISOMERIZACIÓN DE DIVERSOS DISACÁRIDOS

Tras los resultados obtenidos con la sacarosa y visto que la especificidad de este enzima puede no ser absoluta, se decidió evaluar la actividad del enzima con otros disacáridos isómeros de la sacarosa: leucrosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 5)-D-Fru), turanosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Fruf) e isomaltulosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf). Y la glucosil-glucosa isomaltulosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Gl), isómero funcional de la isomaltulosa.

5.2.2.1 ISÓMEROS DE LA SACAROSA - ENSAYO CON ISOMALTULOSA

Tras el estudio de la isomerización de la sacarosa, previamente descrito por otros autores, se procedió al estudio de la isomerización de la isomaltulosa para comprobar cuál era su comportamiento como sustrato de partida. La **Figura R16** muestra los cromatogramas obtenidos tras la reacción de isomerización de la isomaltulosa con sacarosa-isomerasa.

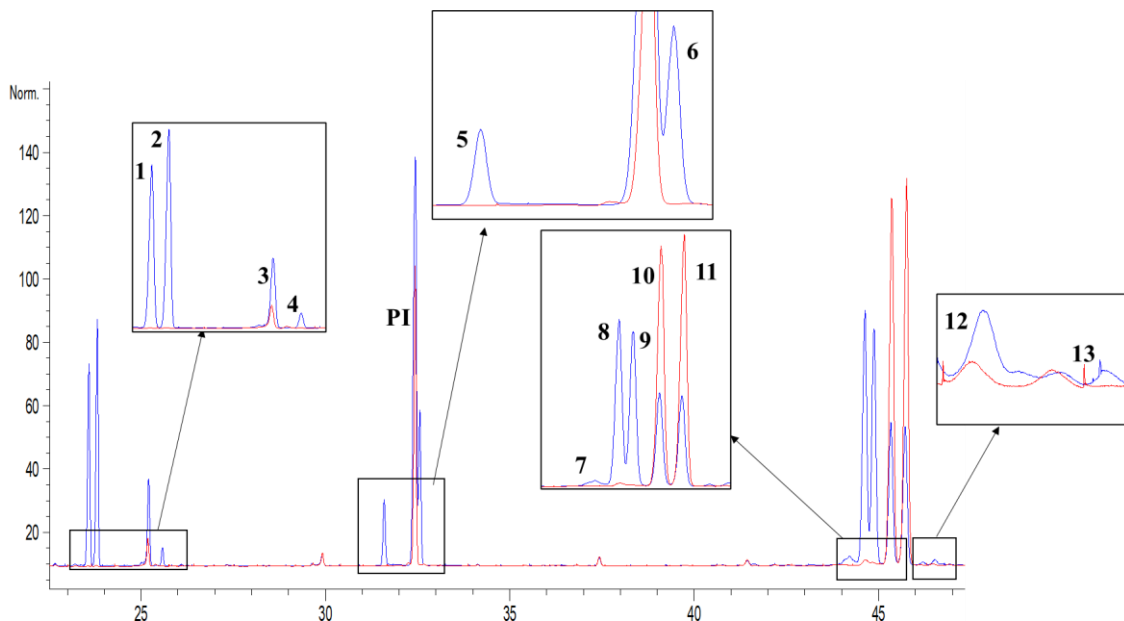


Figura R16. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la isomaltulosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de isomaltulosa y 10^{-3} mg/mL de enzima a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (7) leucrosa, (8 y 9) trehalulosa, (10 y 11) isomaltulosa, y (12 y 13) isomaltosa. . Picos (5 y 6) compuesto no identificado.

Como era de esperar los picos predominantes obtenidos a partir de la isomaltulosa (picos 10 y 11) fueron aquellos correspondientes a la trehalulosa (picos 8 y 9) y, de forma similar al ensayo a partir de la sacarosa, apareció el pico 7 correspondiente a la leucrosa, y dos picos no identificados (5 y 6).

Tabla R11. Datos obtenidos de la isomerización de isomaltulosa (0,2 g/mL), empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($NaH_2PO_4 + MgSO_4$, pH 5, a 30 °C y tiempo de reacción 24 horas. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales.

Tiempo	Fructosa	Glucosa	P5	P6	Leucrosa	Trehalulosa	Isomaltulosa	Isomaltosa
0	0	0	0	0	0	0	100	0
2	$5,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$	$15,4 \pm 0,3$	$74,1 \pm 0,7$	0 ± 0
4	$9,2 \pm 1,5$	$2,0 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,0$	$25,7 \pm 3,1$	$56,2 \pm 5,9$	$0,2 \pm 0,0$
6	$10,1 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,0$	$4,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0$	$29,1 \pm 0,2$	$50,8 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,0$
24	$13,7 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,4$	$44,0 \pm 0,2$	$27,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,0$

La **Tabla R11** recoge los resultados obtenidos a distintos tiempos de reacción. Aunque los productos formados fueron los que cabía esperar, si resulta reseñable el comportamiento de la isomaltulosa como sustrato, quedando tras 24 horas de reacción un 27%, porcentaje mucho menor comparado con el 57,9% que queda en el ensayo de sacarosa. La máxima formación de trehalulosa se da también a las 24 horas, pero en este caso el porcentaje es mucho mayor, 44%, frente al 26,7% obtenido con la sacarosa. Además tiene lugar la formación leucrosa (2,8%) e isomaltosa (0,6%), pero en una concentración algo superior. Y también se produce una mayor hidrólisis de los

disacáridos liberándose un 3% y 13,7%, de glucosa y fructosa, respectivamente, a las 24 horas. Por último, la formación de los compuestos no identificados es máxima a las 24 horas. El aumento en los rendimientos de todos los carbohidratos formados en comparación con la sacarosa puede ser debido al uso directo de la isomaltulosa, es decir, en la reacción de sacarosa esos rendimientos son menores ya que primero el enzima tiene que transformar la sacarosa a isomaltulosa, si bien, en las condiciones utilizadas, esta transformación es casi inmediata, y, posteriormente, isomerizar la isomaltulosa formada en trehalulosa. Para profundizar en este mecanismo sería de gran interés estudiar la relación entre la estructura del enzima y la estructura de ambos sustratos, sacarosa e isomaltulosa.

- ENSAYO CON LEUCROSA

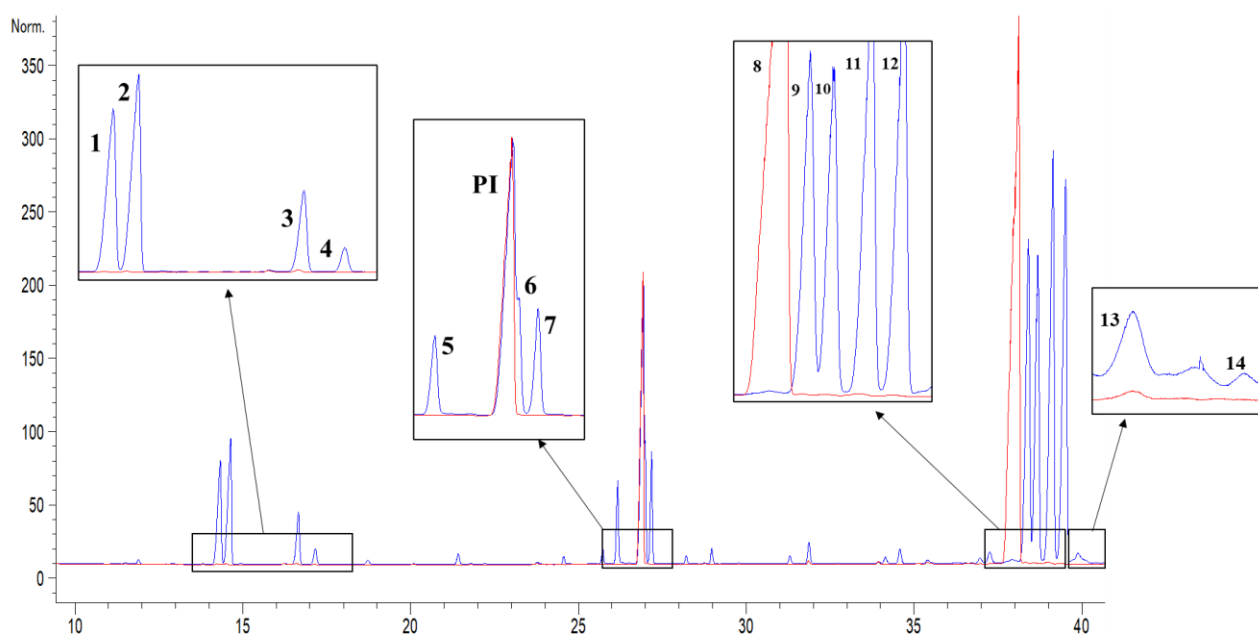


Figura R17. Perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC-FID de la isomerización de la leucrosa con sacarosa-isomerasa, pH 5, 30 °C; 0,2 g/mL de leucrosa y 10^{-3} mg/mL sacarosa-isomerasa a tiempo 0 (rojo) y 24 horas (azul). Picos identificados: (1 y 2) fructosa, (3 y 4) glucosa, (PI) patrón interno, (8) leucrosa, (9 y 10) trehalulosa, (11 y 12) isomaltulosa, (13 y 14) isomaltulosa. Picos (5, 6 y 7) compuesto no identificado.

La **Figura R17** muestra los cromatogramas del ensayo de leucrosa con sacarosa isomerasa, al igual que con el ensayo de sacarosa (**Figura R15**) puede apreciarse que la leucrosa (pico 8) desaparece casi totalmente a las 24 horas de reacción, dando lugar a la aparición de los picos de trehalulosa (9 y 10) e isomaltulosa (11 y 12), y en menor medida isomaltulosa (picos 13 y 14). Por tanto, la leucrosa en presencia de sacarosa-isomerasa parece comportarse igual que la sacarosa. Además, se produce la hidrólisis de la leucrosa, dando lugar a la fructosa (picos 1 y 2) y en menor porcentaje a glucosa (picos 3 y 4), en proporción muy semejante al ensayo de sacarosa. Nuevamente se forman los picos no

identificados 5, 6 y 7 posible producto de la reacción del patrón interno con la sacarosa-isomerasa.

Como se observa en la **Tabla R12** los compuestos formados a las 24 horas de reacción fueron los siguientes: trehalulosa (35,8%) e isomaltulosa (44,0%), con una hidrólisis máxima de fructosa de 8,4% y glucosa (2,4%). Si se comparan estos resultados con los recogidos para la sacarosa, se observa que la formación de trehalulosa es mayor si se produce la reacción partiendo de leucrosa que si se parte de sacarosa (26,7%), en contraposición a lo que ocurre con la isomaltulosa (44%). Por ello, sería interesante un estudio a tiempos menores de la leucrosa para confirmar los rendimientos de reacción en tiempos intermedios ya que puede estar ocurriendo lo mismo que con la sacarosa y que el rendimiento de isomaltulosa no sea máximo a las 24 horas sino a tiempos menores. Hasta nuestro conocimiento no se ha estudiado la reacción del enzima sacarosa-isomerasa con isomaltulosa y leucrosa como sustrato por lo que resulta de interés.

Tabla R12. Datos obtenidos de la isomerización de disacáridos isómeros de la sacarosa (0,2 g/mL), obtenidos durante la reacción a 30°C a las 24 horas de reacción empleando sacarosa-isomerasa (10^{-3} mg/mL) en tampón 0,05 M ($NaH_2PO_4 + MgSO_4$), pH 5. Datos expresados como porcentaje de carbohidratos totales (n=2, media \pm desviación estándar).

Fructosa	Glucosa	P5	P6 + P7	Sacarosa	Leucrosa	Turanosa	Trehalulosa	Isomaltulosa	Isomaltosa
Ensayo sacarosa 24 horas									
9,3 \pm 0,8	2,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	3,3 \pm 0,4	0,1 \pm 0,0	-	-	26,7 \pm 0,2	57,9 \pm 0,2	0,3 \pm 0,03
Ensayo isomaltulosa 24 horas									
13,7 \pm 0,6	3,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	7,0 \pm 0,3	-	2,8 \pm 0,4	-	44,0 \pm 0,2	27,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,0
Ensayo leucrosa 24 horas									
8,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,04	3,2 \pm 1,3	-	0,5 \pm 0,1	-	35,8 \pm 0,1	45,6 \pm 1,9	0,3 \pm 0,1
Ensayo turanosa 24 horas									
0,4 \pm 0,1	-	-	-	-	-	99,6 \pm 0,1	-	-	-
Ensayo isomaltosa 24 horas									
-	6,2 \pm 0,5	1,0 \pm 0,0	2,2 \pm 0,1	-	-	-	-	-	90,7 \pm 0,3

- ENSAYO CON TURANOSA

El otro isómero de la sacarosa que se estudió como sustrato fue la turanosa (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Fruf) y, según los resultados obtenidos con los otros dos isómeros, esperábamos un comportamiento semejante. Sin embargo, tras 24 horas de reacción, no se produjo transformación de la turanosa, (**Tabla R12**). Simplemente se observó una mínima hidrólisis que liberó fructosa (0,4%) por otra parte cabe destacar que los picos no

identificados de ensayos anteriores que salieron en torno al patrón interno no se formaron en este caso.

5.2.2.2 ENSAYO CON ISOMALTOSA

Dado que en el mecanismo indicado para la sacarosa-isomerasa ésta forma el complejo E-S con la glucosa, decidimos probar dicha enzima utilizando como sustrato la isomaltosa, (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Gl), isómero funcional de la isomaltulosa. Tras el ensayo a las 24 horas con sacarosa-isomerasa e isomaltosa no se obtuvo resultado en cuanto a la formación del isómero se refiere (**Tabla R12**). Sí que se observó la presencia de glucosa (6,2%) a rendimientos más elevados que para los otros isómeros de sacarosa estudiados. Igualmente tuvo lugar la aparición de los picos 5 y 6 con un rendimiento de 1% y 2,2%.

El hecho de que en esta reacción aparezca también los picos no identificados alrededor del β -fenil-glucósico, que únicamente no aparecen en la reacción con turanosa, donde no se produce liberación de glucosa. Hace pensar que podría indicar que, probablemente, esos picos correspondan a derivados de la interacción del enzima con el patrón interno. Por ello, para futuros ensayos sería interesante el estudio de esa interacción entre ambos, ya que significaría que no sólo la fructosa y la glucosa pueden actuar como aceptores.

Por tanto, tras el estudio de estos dos últimos disacáridos isomaltosa y turanosa, isómeros de la isomaltulosa y de la sacarosa respectivamente, y no apreciar la isomerización de los mismos puede estar ocurriendo que el enzima sea muy específica para determinadas estructuras, es decir, para el caso de la **isomaltosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Glc) la enzima no actuaría al tener como monómero terminal la glucosa en lugar de una fructosa como ocurre en la **isomaltulosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf) y para el caso de la **turanosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-D-Fruf), sería el enlace (1 \rightarrow 3) el que dificultaría la interacción enzima sustrato, a diferencia de lo que ocurre con los enlaces (1 \rightarrow 2) de la **sacarosa** (α -D-Glc(1 \rightarrow 2)- β -Fruf), (1 \rightarrow 5) de la **leucrosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 5)-D-Fruf) y (1 \rightarrow 6) de la **isomaltulosa** (α -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-D-Fruf), que sí son isomerizadas de forma muy eficaz. Esto es probablemente debido a la conformación enzima / sustrato, por lo que, como ya se ha comentado es un análisis que resultaría de gran interés. Aunque para afrontar este análisis con mayor profundidad sería conveniente ensayar otros sustratos como la maltulosa (4-O- α -D-Glucopiranosil-D-fructosa).

6 CONCLUSIONES

- El proceso de isomerización al emplear glucosa-isomerasa no es completo, alcanzándose rendimientos máximos del 60% para los carbohidratos estudiados. Por tanto, una vez alcanzado cierto equilibrio el rendimiento del isómero se estabiliza.
- El enzima glucosa-isomerasa presenta una alta esteroespecificidad, especialmente para los sustratos D-glucosa y D-xilosa.
- El enzima glucosa-isomerasa es capaz de isomerizar, en distinto grado, todas las pentosas naturales ensayadas; por el contrario, respecto a las hexosas ensayadas sólo isomerizó la D-glucosa y L-ramnosa.
- El enzima glucosa-isomerasa presenta una especificidad de sustrato absoluta para monosacáridos.
- Las reacciones en las que participa la sacarosa-isomerasa no están sujetas a equilibrio de sustrato y productos, por lo que son reacciones en las que se produce, o tiende a producirse, la modificación total del sustrato.
- La sacarosa-isomerasa no presenta una selectividad absoluta de sustrato, es capaz de isomerizar la leucrosa y la isomaltulosa.
- La sacarosa-isomerasa no catalizó la isomerización de turanosa ni isomaltosa, probablemente debido al enlace (1→3) de la turanosa y a la glucosa terminal de la isomaltosa, que impiden la formación del complejo enzima / sustrato y la síntesis de sus respectivos isómeros.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adney, W., McMillan, J., Mielenz, J., Klasson, T. (2009). Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-ninth Symposium. *Springer Science & Business Media*. 146: 101-117
- Ahmed, Z. (2001). Production of natural and rare pentoses using microorganisms and their enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 4(2).
- Amaral-Fonseca, M., Morellon-Sterling, R., Fernandez-Lafuente, R., Tardioli, P. (2021). Optimization of simultaneous saccharification and isomerization of dextrin to high fructose syrup using a mixture of immobilized amyloglucosidase and glucose isomerase. *Catalysis Today*. 362: 175-183.
- Angarita-Dávila, L., Miranda, J., Aparicio-Camargo, D., Parra-Zuleta, K., Uzcátegui-González, M., Céspedes-Nava, V., Durán-Agüero, S., Reyna-Villasmil, N. (2017) Índice glicémico, carga glicémica e insulina posprandial a dos fórmulas isoglucídicas con distintos edulcorantes y fibra en adultos sanos y diabéticos tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*. 34(3): 532-539.
- Angyal, S. (2001). The Lobry de Bruyn–Alberda van Ekenstein transformation and related reactions, In: *Glycoscience: epimerisation, isomerisation and rearrangement reactions of carbohydrates*. 215: 1-14.
- Atkinson, F., Foster-Powell, K., Brand-Miller, J. (2008) International tables of glycemic index and glycemic load values *Diabetes Care*. 31(12): 2281–2283.
- Beerens, K., Desmet, T., Eoetaert, W. (2012). Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39(6): 823–834.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B.; Deshpande, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase: *Microbiological Reviews*: 60: 2: 280.
- Bhuiyan, S., Ami, Y., Izumori, K. (1997). Isolation of an L-rhamnose isomerase-constitutive mutant of *Pseudomonas* sp. Strain LL172: Purification and characterization of the enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84(4): 319–323.
- Bober J., Nair N. (2019). Galactose to tagatose isomerization at moderate temperatures with high conversion and productivity. *Nature Communications*. 10(1): 1–10.
- Cervantes, F. V. (2021). Desarrollo de bioprocesos con enzimas y levaduras libres e inmovilizadas para la síntesis del edulcorante funcional D-tagatosa. Tesis, UAM
- Cheetham, J., Wootton, A.N. Bioconversion of d-galactose into d-tagatose (1993) *Enzyme and Microbial Technology*. 15 (2): 105-108.
- Chevrier C., Le Nouën D., Defoin A., Tarnus C. (2006). Synthesis of amino-L-lyxose phosphonates as fucosyl-phosphate mimics. *European Journal of Organic Chemistry*. 10: 2384–2392.
- Cho, M., Park, S., Lim, J., Kim, J., Kim, J., Kwon, D., Park, C. (2007). Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnol. Lett.* 29: 453–458.
- Contesini, F., Ibaguren, C., Grosso, C., de Oliveira Carvalho, P., Sato, H. (2012). Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. *Journal of biotechnology*, 158(3): 137-143.

- Dehkordi, A., Tehrani, M., Safari, I. (2009). Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase (Sweetzyme IT). *Industrial & engineering chemistry research*. 48(7): 3271-3278.
- Delidovich, I., Gyngazova, M.S., Sanchez-Bastardo, N., Wohland, J.P., Hoppe, C., Drabo, P. (2018). Production of keto-pentoses via isomerization of aldo-pentoses catalyzed by phosphates and recovery of products by anionic extraction. *Green Chemistry*. 20(3): 724-734.
- Delidovich, I., Palkovits, R. (2016). Catalytic Isomerization of Biomass-Derived Aldoses: A Review. *ChemSusChem*, 9(6): 547.
- De-Wulf, P. and Vandamme, E.J. (1997). Production of D-ribose by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48:141-148.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulou, A. J., Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*. 42(15): 6437-6474.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to the sugar replacers xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, lactitol, isomalt, erythritol, D-tagatose, isomaltulose, sucralose and polydextrose and maintenance of tooth mineralisation by decreasing tooth demineralisation (ID 463, 464, 563, 618, 647, 1182, 1591, 2907, 2921, 4300), and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 617, 619, 669, 1590, 1762, 2903, 2908, 2920) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. (2011) *EFSA Journal*, 9 (4), art. no. 2076.
- Esquivel-Solís, V., Gómez-Salas, G. (2007) Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense*. 49(4): 198-202.
- Franke D., Machajewski T., Hsu C., Wong C. (2003). One-pot synthesis of L-fructose using coupled multienzyme systems based on rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Journal of Organic Chemistry*. 68(17): 6828–6831.
- Gao, D., Kobayashi, T., Adachi, S. (2016). Production of keto-disaccharides from aldo-disaccharides in subcritical aqueous ethanol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 80(5): 998-1005.
- Gao, D., Kobayashi, T., Adachi, S. (2017). Promoted isomerization of aldoses to ketoses in subcritical aqueous acetonitrile. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 95(2): 359-363.
- García-Almeida, J., Casado Fdez, M., García Alemán, J. (2013) Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*. 28(4): 17-31.
- Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., Salminen, S., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. y Cani, P. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(8): 491-502.
- Gogar, R., Viamajala, S., Relue, P., Varanasi, S. Techno-Economic Assessment of Mixed-Furan Production from Diverse Biomass Hydrolysates (2021). *Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(9): 3428-3438.
- González, A., Figueroa, V., Batista, C., Casal, A., Álvarez, A., Saadoun, A., Astigarraga, L. (2020). Inclusión de forrajes con distinta relación de fibra soluble e insoluble en la dieta de cerdos. *Archivos de zootecnia*. 69(268): 424-431.
- Hecquet, L., Bolte, J., Demuynck, C. (1996). Enzymatic synthesis of “natural-labeled” 6-deoxy-L-sorbose precursor of an important food flavor. *Tetrahedron*. 52(24): 8223-8232.

- Holub I., Gostner A., Theis S., Nosek L., Kudlich T., Melche R., (2010) Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose). *Br J Nut.* 103(12):1730-7.
- Iqbal, W., Riaz, T., Hassanin, M., Ni, D., Mahmood Khan, I., Rehman, A., Mu, W. (2019). Characterization of a novel D-arabinose isomerase from *Thermanaeromonas toyohensis* and its application for the production of D-ribulose and L-fuculose. *Enzyme and Microbial Technology.* 131: 109427.
- Jin, L., Chen, X., Jin, Y., Shentu, J., Liu, Z., Zheng, Y. (2021). Immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells expressing glucose isomerase using modified diatomite as a carrier for effective production of high fructose corn syrup in packed bed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 44(8): 1781-1792.
- Jokela, J., Pastinen, O., Leisola, M. (2002). Isomerization of pentose and hexose sugars by an enzyme reactor packed with cross-linked xylose isomerase crystals. *Enzyme and microbial technology.* 31(1-2): 67-76.
- Kakinuma, H., Yuasa, H., Hashimoto, H. (1996) Synthesis of 1', 6'-disubstituted sucroses and their behavior as glucosyl donors for a microbial α -glucosyltransferase. *Carbohydrate research.* 284(1): 61-72.
- Kasumi, T., Hayashi, K., Tsumura, N. (1981). Purification and enzymatic properties of glucose isomerase from *Streptomyces griseofuscus*, S-41. *Agricultural and Biological Chemistry.* 45(3): 619-627.
- Kawaguti, H., Celestino, E., Moraes, A., Yim, D., Yamamoto, L., Sato, H. (2010). Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochem. Eng. J.* 48: 211–221.
- Kawaguti, H., Sato, H., (2010). Isomaltulose production by free cells of *Serratia plymuthica* in a batch process. *Food Chem.* 120: 789–793.
- Kim, Y., Kim, D., Park, C. (2018). Production of l-rhamnulose, a rare sugar, from l-rhamnose using commercial immobilized glucose isomerase. *Biocatalysis and Biotransformation.* 36 (6): 417-421.
- Krastanov A, Blazheva D, Stanchev V. (2007) Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor. *Process Biochem.* 42:1655–1659.
- Krastanov A, Blazheva D, Yanakieva I, Kratchanova M. (2006) Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. *Enzyme Microb Technol.* 39:1306–1312
- Langan, P., Sangha, A., Wymore, T., Parks, J., Yang, Z., Hanson, B., Fisher, Z., Mason, S., Blakeley, M., Forsyth, V., Glusker, J., Carrell, H., Smith, J., Keen, D., Graham, D., Kovalevsky, A. (2014) L-Arabinose binding, isomerization, and epimerization by D-Xylose isomerase: X-Ray/Neutron crystallographic and molecular simulation study. 22 (9): 1287-1300.
- Lee, H., Kim, J., Kim, S., Lee, J. (2008). Isomaltulose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from *Protaminobacter rubrum*. *Applied and environmental microbiology.* 74(16): 5183-5194.
- Li, A., Cai, L., Chen, Z., Wang, M., Wang, N., Nakanishi, H., Li, Z. (2017). Recent advances in the synthesis of rare sugars using DHAP-dependent aldolases. *Carbohydrate Research.* 452: 108–115.

- Li, J., Song, X., Wu, T., Zhao, L., Qin, Q., Cheng, M., Zhao, D. (2019). Scalable, efficient and rapid chemical synthesis of L-Fructose with high purity. *Carbohydrate Research*. 480: 67–72.
- Li, S., Cai, H., Qing, Y., Ren, B., Xu, H., Zhu, H., Yao, J. (2011) Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapsodica* NX-5 for isomaltulose hyperproduction. *Appl Biochem Biotechnol*. 163:52–63.
- Lim, R., Oh, D. (2011). Microbial metabolism and biotechnological production of D-allose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(2): 229–235.
- Liu, L., Bilal, M., Luo, H., Zhao, Y., Duan, X. (2021a). Studies on biological production of isomaltulose using sucrose isomerase: status and future perspectives. *Catalysis Letters*. 151(7), 1868-1881.
- Liu, L., Yu, S. y Zhao, Wei. (2021b). A Novel Sucrose Isomerase Producing Isomaltulose from *Raoultella terrigena*. *Applied Sciences*.
- Liu, X., Li, Z., Chen, Z., Wang, N., Gao, Y., Nakanishi, H., Gao, X. D. (2019). Production of L-Ribulose Using an Encapsulated L-Arabinose Isomerase in Yeast Spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67(17): 4868–4875.
- López-Revenga, P. (2020) Estudio del proceso de isomerización química de diversos mono-, di- y oligosacáridos, utilizando como catalizadores aluminato de sodio y cáscara de huevo, para la obtención de carbohidratos enriquecidos en cetosas.
- Mahmood, S., Iqbal M., Riaz, T., Zhang, W., Mu, W. (2020). Characterization of recombinant L-ribose isomerase acquired from *Cryobacterium* sp. N21 with potential application in L-ribose production. *Process Biochemistry*. 97: 1-10.
- MAPA. España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). Informe del Consumo Alimentario en España.
- Martínez, F., Liu, Z., Glawar, A., Yoshihara, A., Izumori, K., Fleet, G., Jenkinson, S. (2014). Short and sweet: D-glucose to L-glucose and L-glucuronic acid. *Angewandte Chemie - International Edition*. 53(4).
- Mayer, J., Conrad, J., Klaiber, I., Lutz-Wahl, S., Beifuss, U., Fischer, L. (2004). Enzymatic production and complete nuclear magnetic resonance assignment of the sugar lactulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(23): 6983-6990.
- McDonald A., Boyce S., Tipton K.F. (2015). Enzyme Classification and nomenclatura. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Meng Q., Zhang T., Jiang B., Mu W., Miao M. (2016). Advances in applications, metabolism, and biotechnological production of L-xylulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(2): 535– 540.
- Miyata, Y., Sugitani, T., Tsuyuki, K., Ebashi, T., Nakajima, Y. (1992) Isolation and Characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* Producing Trehalulose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 56: 1680–1681.
- Nagai-Miyata, Y., Tsuyuki, K., Sugitani, T., Ebashi, T., Nakajima, Y (1993). Isolation and Characterization of a Trehalulose-producing Strain of *Agrobacterium*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 57: 2049–2053.
- Neifar, S., Cervantes, F., Bouanane-Darenfed, A., BenHlima, H., Ballesteros, A., Plou, F., Bejar, S. (2020). Immobilization of the glucose isomerase from *Caldicoprobacter algeriensis* on

- Sepabeads EC-HA and its efficient application in continuous High Fructose Syrup production using packed bed reactor. *Food chemistry*. 309: 125710.
- Nelson L., Michael M. (2014). Glúcidos y glucobiología: los disacáridos contienen un enlace glucosídico. Lehninger (pp 252 – 253).
- Novozymes (2017). Enzymes at work. https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Brochures_Downloads/General-materials/Enzymes_at_work.pdf
- Oh, D. (2007). Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76: 1–8.
- Olivier, S., du Toit, P. (1986) Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. II. Optimization of the xylose isomerase reaction for isomerization of xylose as well as sugar cane bagasse hydrolyzate to xylulose in laboratory-scale units. *Biotechnology and Bioengineering*, 28 (5): 684-699.
- Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Gancarz, M., Szymańska, J. (2021). Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. *Molecules*. 26(4): 1172.
- Orsi, D., Kawaguti, H., Sato, H. (2009). Glucosyltransferase production by *Klebsiella* sp. K18 and conversion of sucrose to palatinose using immobilized cells. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 66-72.
- Pastinen, O., Visuri, K., Schoemaker, H., Leisola, M. (1999) Novel reactions of xylose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25(8-9):695-700.
- Pilak P., Schiefner A., Seiboth J., Öhrlein J., Skerra A. (2020) Engineering a highly active sucrose isomerase for enhanced product specificity using a ‘battleship’ strategy. *ChemBioChem*. 21: 1–10.
- Ravaud, S., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., Aghajari, N. (2006) Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* SIase SmuA. *Acta Crystallogr*. 62: 74–76.
- Ravikumar, Y., Ponpandian, L., Zhang, G., Yun, J., Qi, X. Harnessing L-arabinose isomerase for biological production of D-tagatose: Recent advances and its applications (2021) *Trends in Food Science and Technology*. 107: 16-30.
- Rendleman, J., Hodge, J. (1979). Complexes of carbohydrates with aluminate ion. Aldose-ketose interconversion on anion-exchange resin (aluminate and hydroxide forms). *Carbohydrate Research*. 75, 83-99.
- Roberfroid, M., Gibson, G., Hoyles, L., McCartney, A., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B. (2010). ‘Prebiotic effects: metabolic and health benefits’. *British Journal of Nutrition*. 104(2): 63.
- Ruiz-Matute, A. I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. L., Martínez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B*. 879(17-18); 1226-1240.
- Salvucci, M. E. (2003). Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis in whiteflies, *Bemisia argentifolii*, and *Erwinia rhapontici*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 135: 385–395

- Singh, R., Tiwari, M., Singh, R., Haw, J., Lee, J. (2014). Immobilization of L-arabinitol dehydrogenase on aldehydefunctionalized silicon oxide nanoparticles for l-xylulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(3), 1095–1104.
- Sokołowska, E., Sadowska, A., Sawicka, D., Kotulska-Bąblińska, I., Car, H. (2021) A head-to-head comparison review of biological and toxicological studies of isomaltulose, d-tagatose, and trehalose on glycemic control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Tian, Y., Deng, Y., Zhang, W., Mu, W. (2019) Sucrose isomers as alternative sweeteners: properties, production, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 103(21): 8677-8687.
- Trejo, A., Chavarria, A. (2013). Química de los Carbohidratos. Capítulo 13. (pp 9).
- Tseng W., Wu T., Chang Y., Cheng H., Fang T. (2017) *Journal of Biotechnology*. 259: 168-174.
- Van Laar, A., Grootaert, C., Van Camp, J. (2021). Rare mono-and disaccharides as healthy alternative for traditional sugars and sweeteners. *Critical reviews in food science and nutrition*. 61(5): 713-741.
- Veronese, T., Perlot, P. (1998). Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS letters*. 441(3): 348-352.
- Villamiel M., Montilla A., Olano A., Corzo N. (2014). Production and Bioactivity of Oligosaccharides Derived from Lactose. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. 135-167.
- Vuolanto, A., Pastinen, O., Schoemaker, H., Leisola, M. (2002) C-2 epimer formation of tetrose, pentose and hexose sugars by xylose isomerase. *Biocatalysis and Biotransformation*. 20(4): 235-240.
- White, J. (2014). Sucrose, HFCS, and fructose: History, manufacture, composition, applications, and production. *Fructose, high fructose corn syrup, sucrose and health*.
- Wu L., Birch R. G. (2005). Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Appl Environ Microbiol*. 71:1581–1590.
- Wu, L., Birch, R. (2010). Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: Producer of a highly efficient Slase for isomaltulose biosynthesis. *J. Appl. Microbiol*. 97: 93–103.
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*. 1(1): 38–50.
- Yeo, I., Cho, B., & Kim, J. (2021). Conversion of l-arabinose to l-ribose by genetically engineered *Candida tropicalis*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 1-8.