

Comparison of the FTase activity of extra and intracellular enzymes of fungal origin for the production of scFOS

Comparación de la actividad FTasa de enzimas extra e intracelulares de origen fúngico para la producción de scFOS

M.J. Sánchez-Martínez*, S. Soto-Jover, V. Antolinos-López, A. López-Gómez

Department of Agronomical Engineering, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena. Spain

*mjose.sanchez@upct.es

Abstract

The short-chain fructooligosaccharides (scFOS) are oligosaccharides that have a great interest as prebiotics. Fructosyltransferase enzymes (FTases) carry out the production of scFOS by enzymatic hydrolysis of sucrose. Different microorganisms, including fungi and bacteria, are able to produce these enzymes, however, FTases of fungal origin are most commonly used in the industrial production of scFOS. Due to the high cost of these enzymes, it is interesting to minimize the needed amount of these catalysts by optimizing its specific activity. The present work focuses on the comparison of the fructosyltransferase activity of intracellular and extracellular enzymes of fungal origin. Results showed that intracellular FTase produced by the fungal strain AAC2014 displayed greater specific enzymatic activity than extracellular ones.

Keywords: fructooligosaccharides; fungal fructosyltransferase; intracellular; extracellular.

Resumen

Los fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) son oligosacáridos que tienen gran interés como prebióticos. La producción de scFOS mediante hidrólisis enzimática de la sacarosa es catalizada, entre otras, por la enzima fructosiltransferasa (FTasas). Distintos microorganismos son capaces de producir esta enzima, sin embargo, son las FTasas de origen fúngico las más comúnmente utilizadas para la producción industrial de scFOS. Debido al alto precio de estos catalizadores, es de gran interés optimizar su actividad específica con el fin de disminuir al mínimo la cantidad utilizada de enzima. Por lo anterior, este trabajo se centra en la comparación de la actividad fructosiltransferasa de enzimas intracelulares y extracelulares de origen fúngico. Los resultados mostraron que las FTasas intracelulares producidas por la cepa fúngica AAC2014 presentaban mayor actividad enzimática específica que las extracelulares.

Palabras clave: fructooligosacáridos; fructosiltransferasa fúngica; intracelular, extracelular.

1. INTRODUCCIÓN

Los FOS son carbohidratos prebióticos con efectos positivos en la obesidad y diabetes [1]. Estos oligosacáridos presentan una estructura química compuesta de cadenas lineales de D-

fructosa unidas por enlaces β (2 \rightarrow 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace α (2 \rightarrow 1) [6]. Los FOS pueden ser producidos por transfructosilación de sacarosa mediante las enzimas β -D-fructofuranosidasas (FFasas, EC 3.2.1.26) o transfructosilasas (FTasas, EC 2.4.1.9) [4], dando lugar a FOS de cadena corta (scFOS): 1-kestosa (GF₂), 1-nistosa (GF₃) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF₄) [7,8,10]. Existen numerosos estudios sobre una gran cantidad de hongos con capacidad para la producción de enzimas FTasa las cuales pueden ser extracelulares, cuando se excretan fuera de la célula, o intracelulares cuando permanecen en su interior [2]. *Aureobasidium pullulans* [11] y *Aspergillus niger* [3] son los microorganismos a partir de los que se obtiene las FTasas fúngicas más utilizadas a nivel industrial. Sin embargo, estas enzimas tienen un alto precio lo que conlleva un proceso de producción de scFOS caro. Con el fin de optimizar dicho proceso productivo, así como su posterior aplicación a nivel industrial, el objetivo del presente trabajo ha sido comparar la actividad fructosiltransferasa de enzimas intracelulares y extracelulares sintetizadas por el hongo AAC2014 durante su metabolismo fermentativo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producción de las enzimas FTasas a partir del hongo AAC2014

Para el crecimiento del hongo AAC2014 se emplea el siguiente medio de cultivo: 20% sacarosa, 2% extracto de levadura, 0,84% K₂HPO₄, 0,102% MgSO₄ x 7H₂O, 0,088% KCl, 0,007% FeSO₄ x 7H₂O, 0,085 % NaNO₃ x 4H₂O y 0,136 % CaCO₃ en pH 5,5. Se toman 100 mL de medio y se inocula al 1,0% con 1*10⁷ esporas/mL, y se incuba a 28°C y 180 rpm durante 96 horas. Para la separación de las enzimas intracelulares y extracelulares, se filtra el medio de cultivo en filtro Wathman nº 1. La fase líquida, fuente de enzimas extracelulares, se concentra a vacío hasta 5 veces en volumen. Y la biomasa separada, fuente de enzimas intracelulares (0,7 g), se lava con tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y se congela con 3 mL de este tampón a -18°C.

2.2 Producción de scFOS a partir de enzimas extracelulares

Para la producción de scFOS a partir de enzimas extracelulares se mezclan las enzimas concentradas (20 mL) con una solución de sacarosa de 60ºBrix, en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 y se incuba a 50°C y 50 rpm durante 48 horas, realizando muestreos a lo largo de este tiempo. La inactivación enzimática de cada muestra se realiza mediante baño a 100°C durante 10 minutos.

2.3 Producción de scFOS a partir de enzimas intracelulares

Para la producción de scFOS a partir de enzimas intracelulares se mezclan las enzimas (3 mL+0,7 g) con una solución de sacarosa a 60ºBrix en tampón fosfato 50 mM pH 5,5 y se incuba a 50°C y 50 rpm durante 48 horas, realizando muestreos a lo largo de este tiempo. En cada muestra se realiza una inactivación enzimática en baño a 100°C durante 10 minutos.

2.4 Determinación de azúcares simples y scFOS mediante cromatografía líquida

Para la determinación de azúcares simples y scFOS se ha utilizado un UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) con detector de índice de refracción, con las siguientes características: Cromatógrafo Shimadzu UPLC LC- 30AD system; con columna Asahipak NH2P-50 4E Shodex (Waters); con fase móvil de acetonitrilo-agua (68:32), flujo 1 mL/min, 30°C en la columna, volumen de inyección de 10 μ L, 20 minutos de análisis y una temperatura del índice de refracción de 45°C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Producción de scFOS a partir de la enzima FTasa extracelular obtenida del hongo AAC2014

El rendimiento en la producción de scFOS a partir de las enzimas extracelulares concentradas se determinó como la cantidad de scFOS producido con respecto a la concentración de sacarosa inicial. Podemos observar en la Figura 1A que el rendimiento de transformación ha sido de un 45% y se mantuvo casi estable desde las 30 horas de fermentación enzimática. Por otro lado, el perfil de scFOS obtenido tras 48 horas de fermentación estaba compuesto por 81,16% de GF₂ y 18,8% de GF₃ y ausencia de producción de GF₄ (Figura 1B).

3.2. Producción de scFOS a partir de la enzima FTasa intracelular obtenida del hongo AAC2014

En el caso de la producción de scFOS a partir de las enzimas intracelulares se obtuvo una transformación del 53% de la sacarosa en scFOS. Según vemos en la Figura 2A, la concentración de scFOS se mantuvo casi constante a partir de las 44 horas de fermentación enzimática con 325 g scFOS /L. Sin embargo, el perfil de scFOS (Figura 2B) sigue cambiando tras 44 horas, porque la función hidrolítica ha cesado, pero continúa la función FTasa, dando lugar a la formación de scFOS de estructura más compleja, disminuyendo la cantidad de GF₂ y aumentando la de GF₃ y GF₄. Esta producción de scFOS alcanza un nivel similar a la obtenida por Sánchez et al. (2010) a partir de la biomasa de un cultivo de 48 horas de *Aspergillus* sp. N74 en el que se observó una producción de scFOS de aproximadamente 50% (p/p) (basada en la concentración inicial de sacarosa).

4. CONCLUSIONES

Se obtiene una mayor producción de scFOS a partir de las enzimas intracelulares del cultivo de 96 horas del hongo AAC2014 en comparación con la producción de scFOS obtenida a partir de las enzimas extracelulares concentradas. Por tanto, la actividad FTasa de los enzimas intracelulares es mayor que en los enzimas extracelulares de este hongo, lo que significa que se tendría que utilizar una menor cantidad de estos enzimas para obtener scFOS.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto CDTI (ref. IDI-20141129), llevado a cabo en colaboración con la empresa Zukan S.L., que financia la realización de estas investigaciones y la beca otorgada a M.J. Sánchez para la realización de su tesis doctoral.

6. REFERENCIAS

- [1] Kumar C.G., Sripada S., Poornachandra Y. 2018. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. In Role of Materials Science in Food Bioengineering. Pp.451-503.
- [2] Ganaie M.A., Gupta U.S. 2014a. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. Carbohydr. Polym. 110: 253-258.
- [3] Hidaka H., Hirayama M., Sumi S.A. 1988. Fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 52: 1187-1988.
- [4] Maiorano A.E., Piccoli R.M., Da Silva E.S., de Andrade Rodrigues M.F. 2008. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. Biotechnol. Lett. 30: 1867-1877.
- [5] Mishra S., Mishra H.N. 2013. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. Food Bioprocess. Technol. 6:3166-3176.
- [6] Niness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. Cereal Foods World 44: 79-81.
- [7] Roberfroid M.B., Delzenne N.M. 1998. Dietary fructans. Annu. Rev. Nutr. 18: 117-143.

[8] Sánchez O., Guio F., García D., Silva E., Caicedo L. 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. Food Bioprod. Process. 86: 109-115.

[9] Sánchez O F, Rodriguez A M, Silva E, Caicedo L A. 2010. Sucrose biotransformation to fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. Food bioprocess. Tech. 3: 662-673.

[10] Vega R., Zúniga-Hansen M.E. 2014. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. Biochem. Eng. J. 82 :158-165.

[11] Yun J.W., Song S.K. 1996. Continuous production of fructooligosaccharides using fructosyltransferase immobilized on ion exchange resin. Biotechnol. Bioprocess. Eng. 1: 18-21.

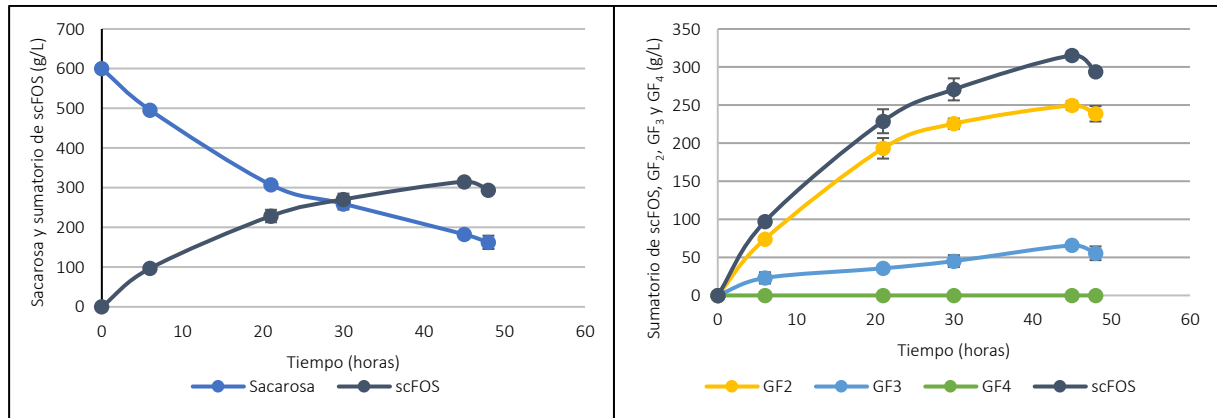


Figura 1A (izquierda). Evolución de la concentración de sacarosa y del sumatorio de scFOS (GF₂+GF₃+GF₄) durante la fermentación enzimática con enzimas extracelulares en solución de 60ºBrix a 50ºC. **Figura 1B (derecha)** Perfil de scFOS según la concentración de GF₂, GF₃, GF₄ y el sumatorio de los mismos (denominado como scFOS) durante la fermentación enzimática con enzimas extracelulares en una solución de 60ºBrix y a 50ºC.

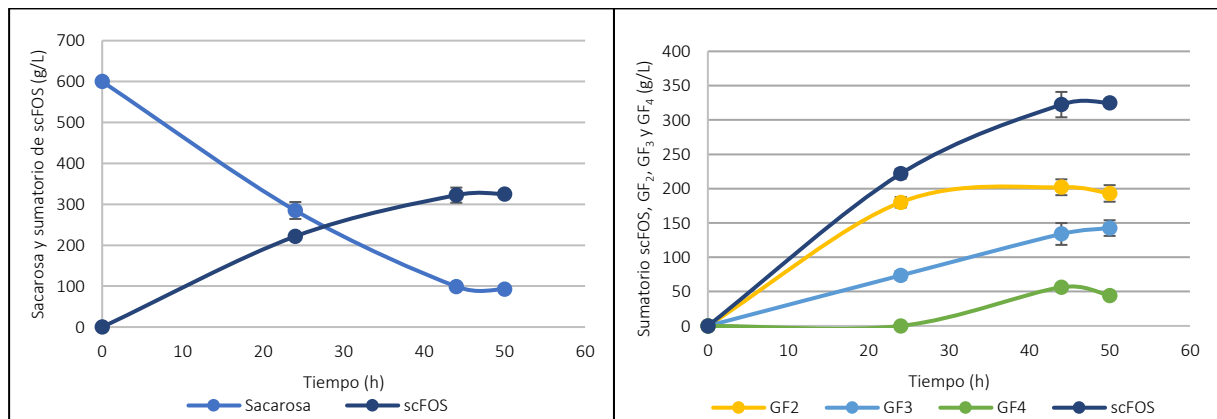


Figura 2 A (izquierda). Evolución de la concentración de sacarosa y del sumatorio de scFOS (GF₂+GF₃+GF₄) durante la fermentación enzimática de las enzimas intracelulares en solución de 60ºBrix a 50ºC. **Figura 2 B (derecha)** Perfil de scFOS según la concentración de GF₂, GF₃, GF₄ y el sumatorio de los mismos (denominado como scFOS) durante la fermentación enzimática con las enzimas intracelulares en una solución de 60ºBrix y a 50ºC.