

Study of the FTase activity of different commercial enzymes for the production of scFOS

Estudio de la actividad FTasa de diferentes enzimas comerciales para la producción de scFOS

M.J. Sánchez-Martínez^{1*}, S. Soto-Jover¹, A. López-Gómez¹

¹Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena, Spain.

*mjose.sanchez@upct.es

Abstract

Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides consisting of linear chains of β (2 \rightarrow 1)-linked fructose with a terminal D-glucose. The production of scFOS by enzymatic hydrolysis of sucrose is carried out by specific fructosyltransferase (FTase) enzymes, but this process is expensive due to the price of these enzymes. Therefore, it is interesting to search for enzymes with FTase activity that are present in the market with other enzymatic activities and have a lower price. Allowing the production of FOS at industrial level with a lower production cost, the FOS will have a lower price in the market.

Keywords: Fructooligosaccharides; Fructosyltransferase; Enzymatic hydrolysis.

Resumen

Los fructooligosacáridos (FOS) son oligosacáridos que consisten en cadenas lineales de D-fructosa con enlaces β (2 \rightarrow 1), que presentan una molécula de D-glucosa terminal. La producción de scFOS mediante hidrólisis enzimática de la sacarosa se realiza mediante enzimas fructosiltransferasas (FTasas) específicas, pero este proceso es caro debido al elevado precio de estas enzimas. Por ello, en este trabajo se realiza una búsqueda de enzimas con actividad FTasa que están presentes en el mercado con otras actividades enzimáticas y tienen un precio menor. Esto permitirá la producción de FOS a nivel industrial con un menor coste de producción y una reducción del precio de los scFOS en el mercado.

Palabras clave: Fructooligosacáridos; Fructosiltransferasa; Hidrólisis enzimática.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una fuerte tendencia de mercado por el consumo de alimentos y bebidas funcionales con prebióticos y probióticos, y desde hace ya algunos años la industria alimentaria se ha centrado en la adición de fructooligosacáridos (FOS) a bebidas y alimentos [1, 5] por su carácter prebiótico [3]. Los FOS son carbohidratos no digeribles, y químicamente son 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) [4]. Los FOS pueden ser producidos mediante dos vías: por hidrólisis de la inulina y mediante transformación enzimática de la sacarosa. Para su aplicación a nivel industrial encontramos que para la hidrólisis de inulina se usan ácidos orgánicos y altas temperaturas, lo cual implica un alto coste y produce residuos y emisiones contaminantes [8]. Este trabajo se centra en la síntesis enzimática de FOS por transfructosilación de sacarosa a través de la ruptura de los enlaces glucosídicos β (2 \rightarrow 1) y la transferencia de la fracción fructosil a una sacarosa o un FOS.

Este proceso es realizado por las enzimas β -D-fructofuranosidasas (FFasas, EC 3.2.1.26) o transfructosilasas (FTasas, EC 2.4.1.9) [2], dando lugar a FOS de cadena corta (scFOS) que son una mezcla de oligosacáridos que contienen una glucosa unida a unidades de fructosa formando los scFOS: 1-kestosa (GF₂), 1-nistosa (GF₃) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF₄) [6,7,9]. Esta vía también tiene alto coste debido al precio de las enzimas FTasas específicas que existen en el mercado. Así, una alternativa es usar preparaciones enzimáticas comerciales de bajo coste, presentes en la industria alimentaria [10], que se comercializan para otra actividad enzimática principal, pero que además presentan actividad FTasa como actividad secundaria. En este estudio se han analizado diferentes preparaciones enzimáticas comerciales de uso común en la industria alimentaria para comparar su actividad FTasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enzimas estudiadas

Las enzimas comerciales con una posible actividad FTasa estudiadas son las denominadas en este trabajo como Enzima (A), Enzima (B), Enzima (C) y Enzima (D), todas del proveedor Novozymes (Dinamarca).

2.2 Producción de scFOS a partir de preparaciones enzimáticas comerciales

Las enzimas (A), (B) y (C) fueron usadas para la producción de FOS según la metodología descrita por Paulino y Zúniga-Hansen (2012). Se partió de tres soluciones azucaradas diferentes, 40, 50 y 60 °Brix con pH 5,5 ajustado con ácido cítrico 0.1 N y se adicionaron 2 mL de enzima por cada 100 g de solución azucarada. La mezcla bien agitada se incubó a 50°C en un baño a 30 rpm. Además, se realizó una comparación de la producción de scFOS mediante la enzima (A) y la enzima (D), para una solución azucarada de 60°Brix (con pH 5.5, ajustado mediante ácido cítrico 0.1N), con una concentración enzimática de 1 mL/100 g de solución azucarada, también bajo unas condiciones de incubación de 50 °C y 30 rpm. Las muestras tomadas en distintos tiempos de reacción se sometieron a una inactivación térmica mediante un calentamiento en baño con agua a 100 °C. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

2.3. 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 (A)

La enzima (A) se comercializa por su actividad pectinasa, pero también tiene actividad FTasa, como se puede observar en la Figura 1 A, donde la enzima muestra un rendimiento de producción de FOS máximo del 70% entre las 6,5 y 8,5 horas de incubación, para la concentración azucarada de 60 °Brix, esto nos indica que la solución de sacarosa más concentrada favorece la actividad FTasa. La mayor velocidad de síntesis de FOS se observa para la solución azucarada menos concentrada, 40 °Brix, al inicio de la reacción (Figura 1 B), mientras que las otras dos concentraciones mantienen la velocidad más constante. En el caso del estudio realizado por Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10], donde también se comprueba la actividad FTasa de la enzima (A),

para una concentración de 536 g/L de sacarosa, se obtiene un rendimiento máximo del 61,1 % en 12 horas de fermentación enzimática.

3.2. Producción de scFOS a partir de la Enzima (B) y (C)

La enzima (B) tiene como actividad principal degradar la lactosa en glucosa y galactosa. Según se puede observar en la Figura 2, la enzima (B) no tiene una buena actividad FTasa, con producciones de scFOS inferiores al 4 % y con grandes desviaciones. La enzima (C) tiene como actividad principal degradar la sacarosa en glucosa y fructosa, es una invertasa, y no se presentan resultados de producción de FOS porque tras 10 horas de ensayo no se detectaron scFOS en la composición del medio de reacción. Sin embargo, Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10] con esta enzima (C) obtuvieron 10,5 g FOS/100 g de sacarosa, partiendo de 536 g/L de sacarosa.

3.3. Comparación de la producción de scFOS mediante (A) y (D)

En la comparación de las enzimas (D) y (A) ambas producen altas concentraciones de FOS, alcanzando un 65-70 % (g FOS /g solución de sacarosa inicial) sin diferencias significativa (Figura 3 A), pero en la Figura 3 B podemos observar que la velocidad de generación de glucosa es mucho mayor en las primeras horas de reacción con la enzima (A). La enzima (D), según Vega-Paulino y Zúniga-Hansen [10] da lugar a una producción de 58,8 g FOS/ 100 g sacarosa inicial en 12 horas de reacción, pero nosotros alcanzamos con esa enzima una producción de 70 g FOS/100 g sacarosa en 48 horas de reacción enzimática.

4. CONCLUSIONES

De las preparaciones enzimáticas comerciales estudiadas sólo la (A) y la (D) poseen una alta actividad FTasa, con un rendimiento de transformación de la sacarosa en FOS similar comprendido entre el 60-70 %. El resto de las preparaciones enzimáticas estudiadas no son adecuadas para la síntesis de FOS a partir de la sacarosa.

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] Flores-Maltos D.A., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R., Teixeira J.A., Aguilar C.N. 2016. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 259-267.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Ninness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World*, 44: 79-81.
- [5] Renuka B., Kulkarni S.G., Vijayanand P., Prapulla S.G. 2009. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT-Food Sci. Tech.* 42: 1031-1033.
- [6] Roberfroid M.B., Delzenne N.M. 1998. Dietary fructans. *Annu. Rev. Nutr.* 18: 117-143.
- [7] 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.

[8] Tomotani E.J., Vitolo M. 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *J. Food Eng.* 80: 662-667.

[9] 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.

[10] Vega-Paulino R.J., Zúniga-Hansen M.E. 2012. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* 76: 44-51.

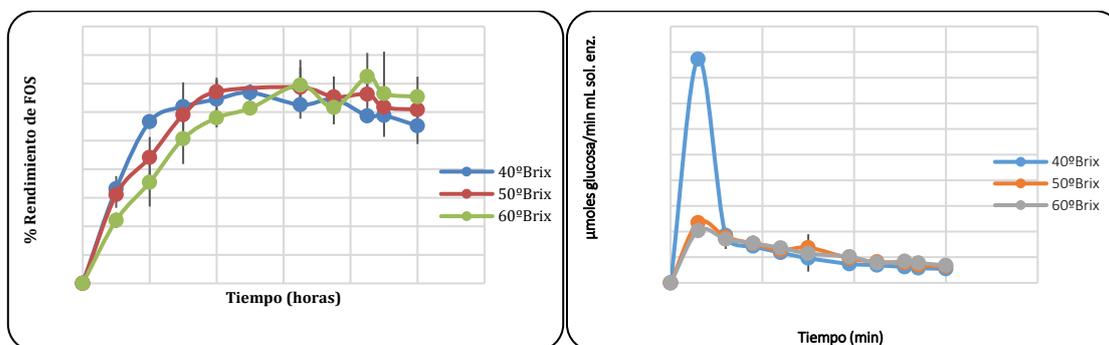


Figura 1. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa *100) para 40, 50 y 60 °Brix mediante la enzima A a 50 °C y 30 rpm (izquierda); Glucosa (µmoles) generada por minuto y mL de enzima para 40, 50 y 60 °Brix a 50 °C y 30 rpm (derecha).

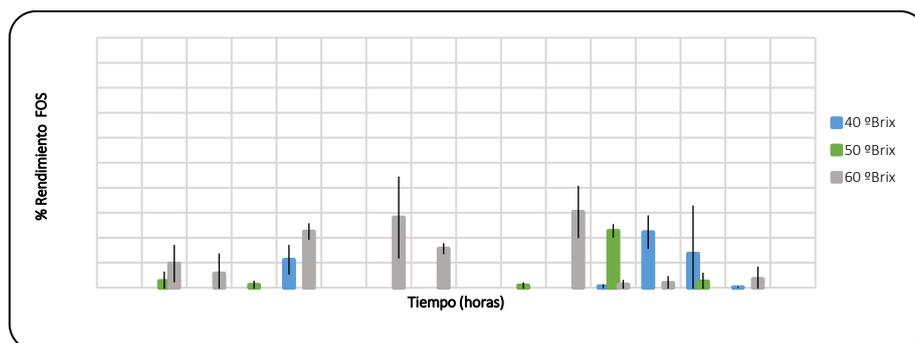


Figura 2. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa *100) para 40, 50 y 60 °Brix mediante la enzima (B) a 50 °C y 30 rpm.

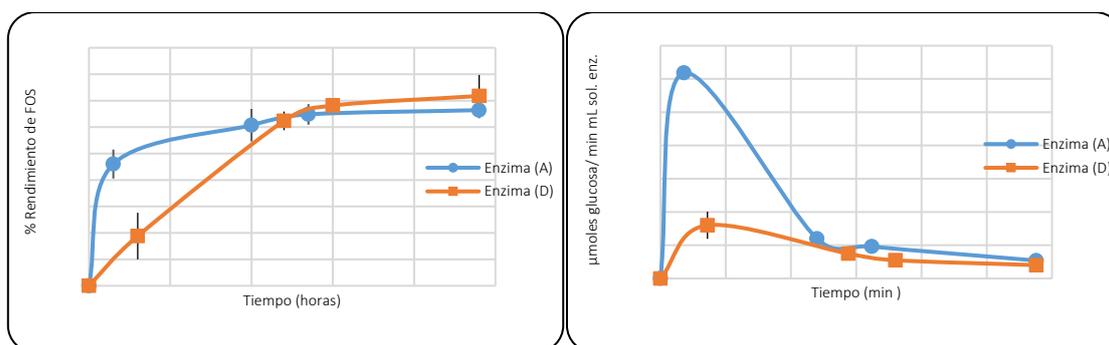


Figura 3. Rendimiento de producción de FOS (g FOS/g sacarosa*100) para las enzimas (A) y (D) (1 mL /100 g) en 60 °Brix, 50 °C y 30 rpm (izquierda); Glucosa (µmoles) generada por minuto y mL de enzima en 60 °Brix a 50 °C y 30 rpm (derecha).