

## Shelf-life analysis of scFOS produced by commercial FTase enzymes

## Análisis de vida útil de scFOS producidos por enzimas FTasas comerciales

M.J. Sánchez-Martínez<sup>1\*</sup>, S. Soto-Jover<sup>1</sup>, V. Antolinos<sup>2</sup>, A. López-Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena. Spain.

<sup>2</sup>Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, 30150 Murcia. 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. These products are used as functional food ingredients and also because of their technological properties. As a part of other foods, they can be included in matrices of different pH and be subjected to different heat treatments during processing or preservation. Therefore, it becomes necessary to study the stability of the scFOS produced under different conditions of temperature and pH.

**Keywords:** fructooligosaccharides; stability; temperature; pH.

### 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). Estos productos se usan como ingredientes de alimentos funcionales así como por sus propiedades tecnológicas. Al ser incluidos como parte de otros alimentos los scFOS pueden ser sometidos a diferentes pH y tratamientos térmicos durante el procesado o conservación. En este escenario, es interesante conocer la estabilidad de los scFOS producidos bajo diferentes condiciones de temperatura y pH.

**Palabras clave:** fructooligosacáridos; estabilidad; temperatura; pH.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el consumidor demanda alimentos y bebidas funcionales que contengan prebióticos y probióticos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para su salud. Los FOS se utilizan, generalmente, como componentes de los alimentos funcionales por su carácter prebiótico (1) y representan aproximadamente el 10 % de los edulcorantes naturales comercializados con unos beneficios esperados de 3,52 mil millones USD para 2024 (2).

Los scFOS son oligosacáridos formados por cadenas lineales de D-fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace  $\alpha$ (2 $\rightarrow$ 1)(3). Estos compuestos pueden ser producidos por transfructosilación de sacarosa mediante las enzimas  $\beta$ -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 (GF<sub>2</sub>), 1-nistosa (GF<sub>3</sub>) y 1-fructofuranosil-nistosa (GF<sub>4</sub>) (5,6,7). Dentro de las muchas aplicaciones industriales de los scFOS, puede destacarse su

uso como ingredientes de mayonesas ligeras, quesos y embutidos bajos en grasas, productos de panadería y productos cárnicos empanados, contribuyendo a la reducción del contenido calórico y a la retención de agua de los mismos. Debido a que el contenido de scFOS en estos alimentos puede variar entre el 2 % y 50 % (2), es importante llevar a cabo un estudio de la estabilidad de los scFOS bajo determinadas condiciones de procesado, tanto en modelos como en alimentos reales. Temperatura, tiempo y pH, parámetros habituales en la elaboración y conservación de alimentos, han sido estudiados por Courtin et al. (8). Los resultados mostraron que los scFOS eran más sensibles a la descomposición alcalina que los fructooligosacáridos de cadena larga (8). El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la estabilidad de scFOS obtenidos mediante fermentación con FTasa comercial frente a distintas condiciones de pH y diferentes tratamientos térmicos durante el periodo de almacenamiento. Los resultados permitirán validar la idoneidad de los scFOS obtenidos para su uso en la industria

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Ensayo de producción de scFOS a partir de la enzima FTasa comercial

Los scFOS utilizados fueron obtenidos mediante fermentación enzimática utilizando como sustrato una solución de sacarosa de 60 °Brix y como catalizador con actividad FTasa la enzima comercial (A) a una dosis de 1 mL/100 g de solución azucarada. El proceso biosintético tuvo lugar a 50 °C durante 48 h.

### 2.2 Ensayo de estabilidad frente a altas temperaturas y distinto pH

Las temperaturas ensayadas fueron 100 y 121 °C. Se preparó tampón citrato-fosfato de tres pHs diferentes: 3, 5 y 7 utilizado para solubilizar scFOS hasta alcanzar una concentración del 15 % (w/v). Las soluciones fueron tratadas en estufa (modelo INB 500, Memmert, Alemania) durante 60 min. En este tiempo se fueron tomando muestras a los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 60 min para su análisis por UPLC con el fin de determinar la concentración de GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub>. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

### 2.3 Ensayo de estabilidad frente a temperatura de almacenamiento y distinto pH

La temperatura ensayada fue 37 °C. Se preparó tampón citrato-fosfato de tres pHs diferentes: 3, 5 y 7, que fueron utilizados para obtener distintas soluciones de scFOS a una concentración de 15 %. Las muestras estuvieron expuestas a 37 °C durante 38 d. Durante este tiempo se fueron tomando muestras en los tiempos 0, 1, 3, 7, 14 y 38 d para su análisis por UPLC con el fin de determinar la concentración de, GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub>. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

### 2.4 Determinación de scFOS mediante cromatografía líquida

Para la determinación de 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 µL, 20 min de análisis y una temperatura del índice de refracción de 45 °C.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Estabilidad de los scFOS a altas temperaturas

#### 3.1.1 *Estabilidad de los scFOS a 100 °C*

Los resultados mostraron que a partir de 30 min de exposición a pH 3 se inicia la hidrólisis de scFOS (Fig. 1A). En las muestras sometidas a pH 5 y pH 7 se observó que el perfil de scFOS se mantuvo casi constante durante los 60 min de tratamiento térmico (Fig. 1B y 1C). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Courtin *et al.* (1), que observaron que el tratamiento de 100 °C a una solución de scFOS con pH 2 y 3 da lugar a hidrólisis de los oligosacáridos.

### 3.1.2 Estabilidad de los scFOS a 121 °C

Cuando el pH de la solución fue 3, los resultados mostraron hidrólisis de los oligosacáridos desde el minuto 5 de tratamiento, siendo GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub> hidrolizados por igual. Cuando el pH de la solución fue 5 y 7, el tratamiento térmico de 121 °C durante 1 h no dio lugar a cambios en la concentración de scFOS (Fig. 2B y 2C). Estos resultados están en consonancia con el trabajo de Courtin *et al.* (1), donde observaron que en una solución a 120 °C ocurre lo mismo que a 100 °C pero más rápido.

### 3.2 Estabilidad de los scFOS a temperatura de almacenamiento 37 °C

Cuando la solución de pH 3 fue conservada a 37 °C se produjo una hidrólisis de los scFOS desde el inicio del ensayo (Fig. 3A). Por su parte, la solución de scFOS a pH 5 mostró una disminución paulatina de los scFOS a partir del día 7 hasta el final de la conservación (Fig. 3B). Finalmente, a pH 7 y 37 °C se observó una disminución de la concentración de scFOS a partir del día 3-4 de conservación (Fig. 3C). Estos resultados concuerdan con los de Vega y Zúniga-Hansen (9), donde se vió la inestabilidad de los GF<sub>3</sub> a tratamientos térmicos entre 75 y 90 °C cuando están en medios con pH de 3,5.

## 4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que las soluciones de scFOS al 15 % sometidas a pH 5 y 7 son estables tras un tratamiento térmico de 1 h a 100 y 121 °C. Sin embargo, en presencia de un pH más ácido (pH 3) tiene lugar la degradación de scFOS tras 20 min de tratamiento. En el caso de conservar a 37 °C, a pH 3 también sucede la hidrólisis de los scFOS pero tras más de 10 días de exposición a esta temperatura. Los scFOS han mostrado ser más resistentes a pH alcalino que ácido.

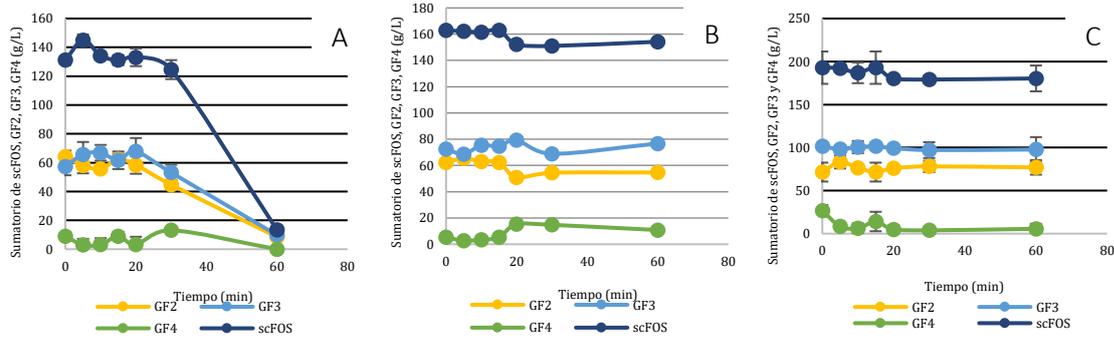
## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto CDTI (ref. IDI-20141129), llevado a cabo en colaboración con la empresa Zukan S.L., que ha financiado estas investigaciones.

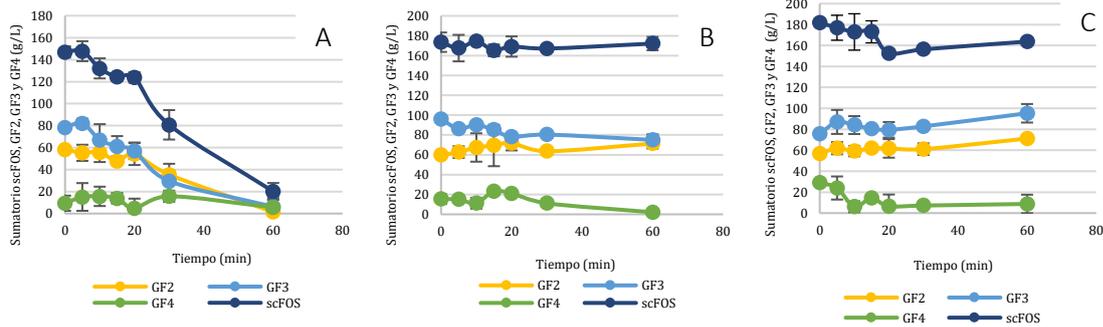
## 6. REFERENCIAS

1. Mishra S, Mishra HN. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food Bioprocess Technol.* 2013;6:3166-76.
2. Kumar CG, Sripada S, Poornachandra Y. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. In *Role of Materials Science in Food Bioengineering.* 2018;451-503.
3. Niness K. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World.* 1999;44:79-81.
4. Maiorano AE, Piccoli RM, Da Silva ES, de Andrade Rodrigues MF. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett.* 2008;30:1867-77.
5. Roberfroid MB, Delzenne NM. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr.* 1998;18:117-43.

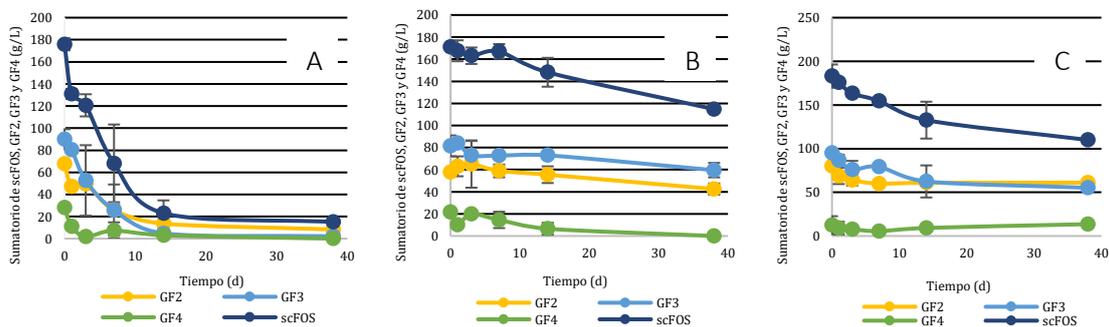
6. Sánchez O, Guio F, García D, Silva E, Caicedo L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. Food Bioprod Process. 2008;86:109-15.
7. Vega R, Zúniga-Hansen ME. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. Biochem Eng J. 2014;82:158-65.
8. Courtin CM, Swennen K, Verjans P, Delcour J A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxyloligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. Food Chem. 2009;112:831-7.
9. Vega R, Zuniga-Hansen ME. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. Food Chem. 2015;173:784-9.



**Figura 1.** Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub> durante 1 h a 100 °C, de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C).



**Figura 2.** Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub> durante 1 h a 121 °C de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C).



**Figura 3.** Evolución de la concentración del sumatorio de scFOS, GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub> durante 38 d a 37 °C de una solución con 15 % de scFOS y pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7 (C)