

New biotechnological processes for manufacturing scFOS in the liquid sugar industry

Nuevos procesos biotecnológicos de fabricación de scFOS en la industria de azúcares líquidos

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 short chain FOS (scFOS) have character prebiotic, so they are interesting food ingredients. The scFOS production can be performed by hydrolysis of inulina or by polymerization using fructosyltransferases (FTase) enzymes. The FTases are mainly produced from fungi, such as *Penicillium* sp, and *Aspergillus* sp., among others. Some of these enzymes are marketed but not for manufacturing scFOS because of its relatively high price. In this work, new sources (fungi) and technologies for obtaining FTase enzymes, and producing scFOS, will be studied at laboratory and bioreactor scales, for industrial production of scFOS in two stages of submerged fermentation (SmF): a first SmF step for production of FTase from the selected mould, and a second SmF step for obtaining scFOS by enzymatic fermentation, from these FTases produced in sucrose solution.

Keywords: fructooligosaccharides; fungi fructosyltransferase production; Two stages; SmF.

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. Los FOS de cadena corta (scFOS) tienen carácter prebiótico por lo que son interesantes como ingredientes alimentarios. La producción de scFOS se puede realizar mediante hidrólisis de inulina o mediante polimerización a partir de enzimas fructosiltransferasas (FTasas). Las FTasas se producen sobre todo a partir de hongos, como *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp., entre otros. Algunas de estas enzimas FTasas están presentes en el mercado, aunque no para fabricar scFOS porque presentan un precio relativamente elevado. Por ello, en este trabajo se estudiarán, a escala de laboratorio y biorreactor, nuevas fuentes (hongos) y tecnologías de producción de FTasas y de scFOS, para conseguir una producción industrial de scFOS mediante fermentación sumergida en dos etapas (SmF): una primera etapa SmF para la producción de FTasas a partir del hongo y una segunda etapa SmF de producción de scFOS a partir de estas FTasas en una solución de sacarosa.

Palabras clave: fructooligosacáridos; producción de fructosiltransferasa de hongos; dos etapas; SmF.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos y bebidas funcionales que contienen prebióticos y probióticos se ha convertido en una fuerte tendencia de mercado a nivel mundial. En particular, desde hace ya algunos años, la industria alimentaria está explotando todas las posibilidades de adición de fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) a alimentos y bebidas [5,8]. Estos fructooligosacáridos producen efectos beneficiosos en la salud debido a que son fibra dietética y además tienen un efecto prebiótico [9].

Los scFOS son carbohidratos no digeribles, que tienen un grado de polimerización menor que 9 y están químicamente compuestos por cadenas lineales de D-fructosa unidas entre sí mediante enlaces β (2 \rightarrow 1), con una molécula de D-glucosa terminal unida a una fructosa por un enlace α (2 \rightarrow 1) [7]. Los scFOS más representativos son 1-kestosa (GF2, o DP3), 1-nistosa (GF3; o DP4), y 1F-fructofuranosilnistosa (GF4, o DP5) [2,4]. Existen dos vías principales para la producción de FOS. Por un lado, está la producción de FOS mediante la hidrólisis de la inulina. Y por otro lado, está la síntesis enzimática de FOS que se lleva a cabo 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 cualquier aceptor que no sea agua, como sacarosa o un fructooligosacárido. La principal enzima usada en esta síntesis enzimática es la fructosiltransferasa (FTasa), que se obtiene principalmente de fuentes fúngicas [2,6,10]. Por ejemplo, la actividad fructosiltransferasa de enzimas obtenidas a partir de diferentes especies de *Aspergillus* da lugar a una transformación de hasta el 61% de la sacarosa en scFOS [1].

Actualmente no existen enzimas en el mercado para la producción específica de scFOS (con actividad FTasa), pero en la bibliografía existen estudios de preparados enzimáticos comerciales destinados a otros fines que presentan actividad de transfructosilación, obteniendo altos rendimientos de producción de scFOS a partir de sacarosa, pero estas enzimas presentan un alto precio de mercado.

La fabricación industrial de FOS tiene lugar mediante fermentación sumergida en dos etapas (SmF). Una primera etapa para la producción y purificación de los enzimas FTasas a partir del hongo y una segunda etapa de producción de scFOS a partir de estos enzimas FTasas en una solución de sacarosa. Pero, también se puede llevar a cabo la producción de scFOS en una sola etapa, obteniendo buenos rendimientos de producción de scFOS [3, 11, 12]. Por ello, se están llevando a cabo diversos estudios sobre la producción de scFOS, con el objetivo de conseguir procesos de producción más eficaces, con mejores rendimientos de producción de scFOS, y menores costes. El aumento de la productividad se puede lograr mediante el uso de diferentes métodos fermentativos y diferentes sustratos y fuentes microbianas de enzimas productoras de FOS, así como la optimización de las condiciones de cultivo [4].

En este trabajo se pretende estudiar, por un lado, nuevas fuentes fúngicas de enzimas con actividad FTasa y, por otro lado, la producción de scFOS mediante SmF, así como los factores que determinan su rendimiento y los costes de su producción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Producción de enzimas con actividad de transfructosilación a partir de fuentes fúngicas.

En primer lugar se realizará una selección de cepas fúngicas con producción de enzimas con actividad FTasa. Una vez las cepas estén seleccionadas se incubarán en un medio de cultivo apropiado para cada microorganismo, con el objetivo de conseguir la mayor producción de enzimas, extracelulares e intracelulares, bajo condiciones de temperatura, aireación y agitación controladas. Transcurrido el tiempo necesario se realizará la separación de los enzimas intracelulares y extracelulares mediante procesos de filtración y centrifugación para el posterior

uso de los enzimas en la segunda etapa. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

2.2 Producción de scFOS a partir de los enzimas con actividad FTasa obtenidos de fuentes fúngicas.

La producción de FOS tendrá lugar mediante una fermentación enzimática SmF, a partir de enzimas con actividad FTasa obtenidos del cultivo de diferentes hongos, en una solución concentrada de sacarosa, bajo condiciones de temperatura, pH y agitación controlados, durante un tiempo suficiente para el máximo consumo de la sacarosa inicial y la mayor producción de scFOS. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

2.3 Determinación de la cinética de los procesos de fermentación enzimática. Análisis de los azúcares simples y scFOS producidos.

Para la determinación de azúcares simples y FOS de cadena corta se utilizará un Cromatógrafo UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) con detector de índice de refracción. Estos estudios se llevarán a cabo a escala de laboratorio (en matraz de 250 mL) y a escala de biorreactor de 7 L.

3. RESULTADOS

Se pretende estudiar todas las enzimas comerciales con actividad FTasa que puedan tener uso interesante para la producción de scFOS a escala industrial, y mediante fermentación SmF. También, se tratará de encontrar un hongo con gran capacidad de producción de enzimas con actividad FTasa, con un alto rendimiento de transformación de la sacarosa en scFOS en fermentación SmF. Además se optimizarán todas las variables que afectan a la producción de los enzimas FTasas, así como a la producción de scFOS por fermentación SmF, obteniendo el mayor rendimiento de producción de scFOS (aproximadamente del 60%), con un coste adecuadamente bajo. Se quieren obtener resultados adecuados a escala de laboratorio (matraz de 250 mL), que permitan realizar el escalamiento a biorreactor de 7 L, y luego a 12 L, para extraer datos que permitan la fabricación de scFOS a escala industrial, con las FTasas seleccionadas y producidas, y con procesos y costes optimizados.

4. 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.

5. REFERENCIAS

- [1] Fernández-Arrojo L., Álvaro M., Ghazi I., De Abreu M., Linde D., Gutiérrez-Alonso P., Fernández-Lobato M. 2007. On the transfructosylation activity and selectivity of microbial β -fructofuranosidases for the production of prebiotics. *J Biotechnol.* 131(2): S107.
- [2] Crittenden R.G., Playne, M. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Tech.* 7(11): 353-361.
- [3] Domínguez A., Nobre C., Rodrigues L.R., Peres A.M., Torres D., Rocha I., Teixeira J. 2012. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydr poly.* 89(4): 1174-1179.

- [4] Dominguez A.L., Rodrigues L.R., Lima N.M., Teixeira J.A. 2014. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food Bioprocess Tech.* 7(2): 324-337.
- [5] 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(2): 259-267.
- [6] Ganaie M.A., Gupta U.S., Kango N. 2013. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. *J. Mol. Catal B- Enzym.* 97, 12-17.
- [7] Niness K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World.* 44(2): 79-81.
- [8] 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. Technol.* 42(5): 1031-1033.
- [9] Rubio C., Latina C., Navarro A. 2012. Producción de fructooligosacáridos por invertasa de *Aspergillus niger* IB56: un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. *Boletín Microbiológico.* 27(1).
- [10] Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci. Technol.* 50(1): 1-16.
- [11] 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.
- [12] 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.