

TÍTULO: PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE LA SACAROSA USANDO ENZIMA FRUCTOSILTRANSFERASA RECOMBINANTE

Autores: Ing. Enrique Rosendo Pérez Cruz. enrique.perez@cigb.edu.cu

Ing. Duniesky Martínez García

Ing. Alina Sobrino Legón

Institución: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Cuba.

RESUMEN

Este trabajo presenta el desarrollo de un biocatalizador no fúngico que convierte la sacarosa de forma eficiente en fructooligosacáridos de cadena corta, en particular 1-kestosa (GF2). La enzima seleccionada es la sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SSTrec) de origen vegetal expresada constitutivamente a niveles altos en *Pichia pastoris*. Después de una fermentación en cultivo incrementado, la enzima recombinante es recobrada del sobrenadante de cultivo con pureza superior al 75 % a través de una etapa de ultrafiltración-concentración, para posteriormente ser liofilizada. La reacción de la enzima libre a altas concentraciones de sacarosa (600-800 g/L) ocurre en un reactor tanque agitado para producir 1-kestosa, la cual representa más del 50% de los azúcares totales en la mezcla de reacción. Esta mezcla puede ser separada y refinada por diferentes tecnologías existentes en industrias de los derivados de la caña de azúcar para obtener fructooligosacáridos de alta pureza, los que son muy demandados en las industrias farmacéuticas y de alimentos funcionales.

Palabras clave: enzima fructosiltransferasa; fructooligosacáridos; 1-kestosa; derivados del azúcar

TITLE: SUSTAINABLE PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES FROM SUCROSE USING FRUCTOSYLTRANSFERASE RECOMBINANT ENZYME

ABSTRACT

This paper presents the development of a non-fungal biocatalyst that efficiently becomes sucrose into short-chain fructooligosaccharides, particularly 1-kestose

(GF2). The chosen enzyme is the sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SSTrec) of plant origin and produced constitutively to high levels in the yeast *Pichia pastoris*. After fed-batch fermentation, the culture supernatant containing the recombinant enzyme with initial protein purity above 75% is dialyzed and concentrated by a single ultrafiltration step and then submitted to a lyophilisation process. The free enzyme is operated in a stirred tank reactor at high sucrose concentrations (600-800 g/L) to produce 1-kestose, which reaches to represent more than 50% of total sugars in the reaction mixture. This mixture can be separated and polished by different existing technologies in the industry of the sugar cane's derivatives, in order to get high purity fructooligosaccharides, which have a great demand in the pharmaceutical and functional foods industries.

Key words: fructosyltransferase enzyme; fructooligosaccharides; 1-kestose; sugar derivatives

INTRODUCCIÓN

Los fructooligosacáridos (FOS) están compuestos por cadenas lineales con 1-9 residuos de fructosa enlazados a una molécula de sacarosa por enlace β 2 \rightarrow 1 (Yun, 1996). La importancia de estos compuestos radica en que pueden utilizarse como ingredientes no digeribles de la dieta, tanto de humanos como de animales, que brinda un efecto prebiótico, al producir efectos beneficiosos mediante la estimulación selectiva del crecimiento o la actividad de uno o más tipos de microorganismos en el colon. Entre dichos microorganismos se encuentran *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* (Gibson, 1995). En la naturaleza, los FOS son producidos por acción de enzimas tipo fructosiltransferasas (FTasa, EC 2.4.1.9) y β -fructofuranosidasas (FFasa EC 3.2.1.26) de plantas, hongos, bacterias y algunas levaduras (Guío *et al.*, 2009). La producción industrial de FOS, actualmente, se realiza mediante dos estrategias: degradación parcial de inulinas (Yun, 1996; Franck, 2002) o síntesis enzimática a partir de la sacarosa, con empleo de enzimas FFasa con alta actividad transfructosilasa o FTasa, producidas por hongos (*Aspergillus sp* y *Aureobasidium pullulans*) (Domínguez *et al.*, 2014; Ganaie, Lateef & Gupta, 2014). Ambas tecnologías dan lugar a una mezcla de FOS, que varía su grado de polimerización (GP) de 2 a 10, cuyos principales

componentes son: 1-kestosa (GF₂), nistosa (GF₃), fructosilnistosa (GF₄), bifurcosa (GF₃), inulobiosa (F₂), inulotriosa (F₃) e inulotetraosa (F₄). La 1-kestosa es el FOS de mayor interés comercial, por su doble efecto de edulcorante hipocalórico y prebiótico, así como por su posible uso como azúcar para diabéticos (Vega & Zúniga, 2011).

El mercado de FOS mantiene una tendencia creciente y según los Analistas de Industrias Globales Inc. (GIA), alcanzará en los Estados Unidos \$225,1 millón para 2015, mientras se espera que las ventas europeas lleguen a los \$1,17 mil millones (Choi, Han & Kim, 2015). En China, los FOS (polvo con un 95% pureza) se comercializaron en diciembre del 2012 a un precio de \$ 8 347 USD/t (Guo, Ou & Yinle, 2013). En el futuro, mantener una tendencia creciente en el mercado de FOS, precisa de reducir sus costos de producción y expandir sus aplicaciones en la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos.

Los complejos procesos tecnológicos de bajos rendimientos en extracción y purificación de las enzimas FFasa y FTasa (Maiorano *et al.*, 2008; L'Hocine *et al.*, 2000), ha conducido a que se empleen sistemas inmovilizados de células o enzimas en la transfructosilación industrial de la sacarosa en FOS (Yun, 1996; Yun & Song, 1999). Además, esta situación tecnológica es la causa de que no existan enzimas fructosiltransferasas comerciales para uso industrial (Vega & Zúniga, 2012) y que, por tanto, tenga que coexistir en una misma fábrica la producción de biocatalizador y producción de FOS.

Una alternativa para simplificar los procesos de extracción de enzimas para producir FOS, es la obtención de fructosiltransferasas recombinantes a partir de su expresión en la levadura *Pichia pastoris*. Mediante esta estrategia, en el laboratorio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, se obtuvo altos niveles de expresión constitutiva en *P. pastoris* de la enzima sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SSTrec) de origen vegetal (Pérez *et al.*, 2014).

Por lo expuesto, el empleo de esta cepa recombinante en la obtención de una enzima fructosiltransferasa y su potencial uso en la producción industrial de FOS, son descritos como objetivo en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de 1-SSTrec.

La cepa recombinante de *Pichia pastoris* CIGB 308 fue cultivada en un fermentador de 5 L mediante una estrategia de cultivo incrementado. Durante la fase de cultivo discontinuo, la cepa creció en un medio salino suplementado con sacarosa 50 g/L y extracto de levadura 5 g/L y en la fase de incremento se suministró una solución de sacarosa 500 g/L. La temperatura se mantuvo a 28°C y el pH 5,5. Fueron variados la agitación de 500 a 900 rpm y el flujo de aire de 1 a 2 volumen de aire/volumen de medio (vvm), para mantener el oxígeno disuelto superior a 20%. La duración de la fermentación fue de 72 horas. Posteriormente, el cultivo se centrifugó para separar la biomasa de sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo fue filtrado por 0,2 μm , antes de ser concentrado y diafiltrado en ultrafiltro de 30kDa. Por último, el extracto crudo de 1-SSTrec fue liofilizado.

Actividad enzimática

Una unidad de actividad enzimática (U) de 1-SSTrec se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto a velocidades iniciales de la reacción, en una solución de sacarosa a 1,46 M en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 a 30°C

Producción de fructooligosacáridos

Un reactor enchaquetado tipo tanque agitado fue alimentado con una solución de sacarosa a concentraciones de 600-800 g/L y pH 5,5 a 25°C y se le adicionó 1-SSTrec a razón de 900- 6 000 U/L una vez alcanzada la temperatura de operación de 45°C. La agitación fue controlada para mantener el sistema homogéneo. El tiempo de reacción fue determinado por simulación con el software Matlab de la reacción cinética, de la desactivación enzimática y la transferencia de calor.

Cuantificación de fructooligosacáridos

El análisis cuantitativo de las muestras se realizó por HPLC de un sistema isocrático combinado con detección por índice de refracción para el análisis de carbohidratos. Se aplicaron 20 μL de muestra a una columna Aminex HPX 42-C

(BioRad, Richmond), con un flujo de trabajo de 0,5 mL/min, una presión de aproximadamente 52 bar y una temperatura de trabajo de 85°C. El solvente utilizado fue agua destilada. Se empleó un detector de índice de refracción Knauer Differential-Refractometer. Los resultados se analizaron con ayuda del paquete informático BioCrom, versión 3,0, CIGB, 1996-1997.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de la cepa de *Pichia pastoris* CIGB 308 en las condiciones descritas en la sección materiales y métodos, permitió obtener rendimientos de $375,0 \pm 9,2$ g/L de peso húmedo, la actividad enzimática extracelular fue de $101,6 \pm 9,5$ U/mL y la intracelular $38,9 \pm 5,4$ U/mL ($103,7$ U/g de biomasa húmeda equivalente a $364,4$ U/g de peso seco). Estos rendimientos de actividad en biomasa por litro de cultivo, son superiores de cinco a seis veces a los máximos al reportado para cepas de hongos que emplearon las células en conformar biocatalizadores para producir FOS [15,16,17, 18]. En cuanto a los niveles obtenidos de actividad extracelular de $101,6 \pm 9,5$ U/ml, clasifica como rendimientos altos, que superan la media de los máximos reportados para enzimas FTasa o FFasa producidas por cepas de hongos cultivadas en fermentadores (Vaňková, Antošová & Polacovič, 2005; Dhake & Patil, 2007; Driouch, Roth, Dersch & Wittmann, 2010).

Los rendimientos de la extracción de 1-SSTrec a partir del sobrenadante de cultivo, mediante la forma descrita en la sección materiales y métodos fue de $81\ 360$ U/L de cultivo, equivalente a $22,1$ g de liofilizado con una actividad específica de $18\ 400$ U/g. El recobrado fue superior al 95% y pureza de la enzima mayor al 75% por SDS-PAGE. La 1-SSTrec liofilizada fue estable a temperatura ambiente al menos por un año.

La producción de FOS catalizado por la 1-SST muestra un similar perfil de producto para todas las concentraciones de sacarosa ensayadas mostrado en la figura I.

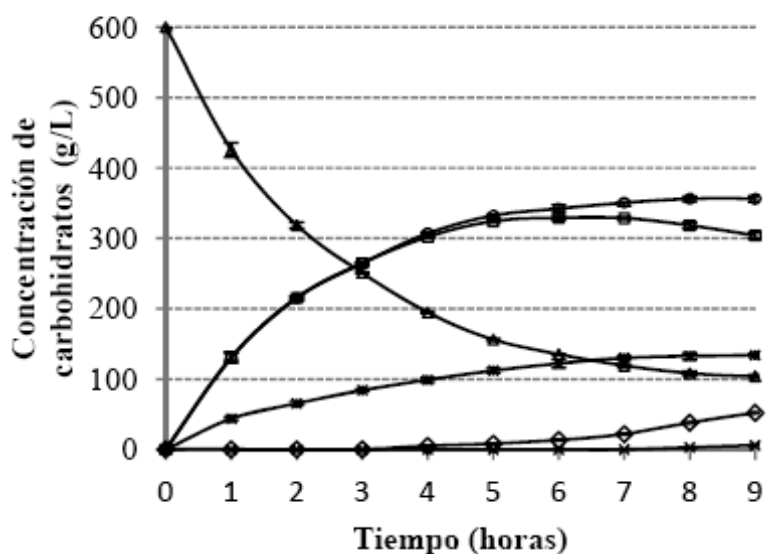


Figura I: *Curso temporal de la reacción catalizada por la 1-SSTrec a 600 g/L de sacarosa inicial en 0,1 M de tampón acetato de sodio pH 5,5, 45°C, y 100 rpm. Los datos representan las medias de tres experimentos \pm la desviación estándar y los símbolos (Δ) Sacarosa, (\square) 1-kestosa, (\diamond) Nistosa, (x) Glucosa, ($*$) Fructosa, (o) FOS*

Los máximos rendimientos alcanzados fueron de 55-60% de FOS, con la particularidad que la composición de 1-kestosa es superior al 50% de carbohidratos totales en la mezcla y más del 90 % entre los FOS. Esta composición de 1-kestosa (>50%) es muy superior a las obtenidas por enzimas fúngicas (<35%), para similar conversión de sacarosa en FOS (Kovács *et al.*, 2013). Este resultado constituye una ventaja tecnológica adicional del uso de la 1-SSTrec en la producción FOS, pues de aplicar las tecnologías existentes para separación de azúcares industrial (ejemplo: Cromatografía de Lecho Móvil Simulado o adsorción a carbón activado), que discriminen mono y disacáridos de los fructooligosacáridos, se obtendrá un licor de 1-kestosa de una pureza superior al 90% y que además posibilita su cristalización (Nishizawa *et al.*, 2002). Productos de similar grado de pureza solo existen en el mercado para propósitos analíticos a precios prohibitivos para su uso en alimentos funcionales o nutracéuticos.

CONCLUSIONES

La descripción del proceso de producción de FOS con la enzima generada por la levadura *Pichia pastoris* modificada genéticamente, permitió precisar que:

- Sencillez del proceso de producción comparado con otros existentes.
- Obtención de altos rendimientos.
- La formulación en polvo es estable a temperatura ambiente al menos por un año.
- Fácil introducción como innovación tecnológica en fábricas existentes.
- Convierten a la 1-SSTrec en la fructosiltransferasa de uso industrial demandada para la expansión de la producción de FOS.
- Su empleo en la producción industrial de FOS generará un producto de mayor calidad a los existentes en el mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Choi, J. M., Han, S. S. & Kim H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol Adv.*, (6). doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.

Dhake, A. B. & Patil, M. B. (2007). Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. *Braz J Microbiol*, (38), 194-199.

Domínguez, A. L. *et al.* (2014). An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. *Foods and Bioprocess Technol*, (7), 324-337.

Driouch, H., Roth, A., Dersch, P. & Wittmann, C. (2010). Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, (87), 2011-2024.

Franck, A. (2002). Technological functionality of inulinand oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(2), S287-S291.

Ganaie, M. A., Lateef, A. & Gupta, U. S. (2014). Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* (172), 2143-2159.

Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*, 125(6), 1401-1412.

Guío, F. *et al.* (2009). Recent trends in fructooligosaccharides production. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(3).

Guo, Z., Ou, S. & Yinle, Z. (2013). Export overview of some sweeteners and raw materials in China. *Sweeteners China News*, 3(1).

Kovács, Z. *et al.* (2013). Recent Developments in Manufacturing Oligosaccharides with Prebiotic Functions. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* DOI: 10.1007/10_2013_237 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

L'Hocine, L. *et al.* (2000). Purification and partial characterization of fructosyl transferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *Journal of Biotechnology*, (121), 73-84.

Maiorano, A. E. *et al.* (2008). Microbial production of fructosyltransferases for síntesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett* (30), 1867-1877.

Nishizawa, K. *et al.* (2002). Crystalline 1-kestose and process for preparing the same. *Patent* (2002) US6479657 (B1).

Pérez, E. R. *et al.* (2014). Método de obtención de 1-kestosa. *Patente WO* 2014/044230 A1.

Vaňková, K., Antošová, M. & Polacovič, M. (2005). Design and economics of industrial production of fructosyltransferase. *Chem Pap*, 59, 441-448.

Vega, R. & Zúniga Hansen, M. E. (2012). Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (76), 44- 51.

Vega, R. & Zúniga Hansen, M. E. (2011). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresource Technology*, (102), 10180-10185.

Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides Occurrence, preparation and application. *Enzyme and Microbial Technology*, (19), 107-117.

Yun, J. W. & Song, S. K. (1999). *Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose*. Methods in Biotechnology, Vol. 10: Carbohydrate Biotechnology Protocols. Totowa, NJ: Edited by: C. Bucke © Humana Press Inc.