

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Purificação de Oligossacarídeos Utilizando Colunas de Leito Fixo de Zeólitas

Autor: Raquel Cristine Kuhn

Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP

Agosto/2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K955p Kuhn, Raquel Cristine
Purificação de oligossacarídeos utilizando coluna de leito fixo
de zeólitas / Raquel Cristine Kuhn. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Purificação. 2. Zeólitos. 3. Oligossacarídeos. 4.
Síntese enzimática. 5. Coluna de leito fixo. I. Maugeri Filho,
Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Oligosaccharides purification using fixed bed column of zeolites
Palavras-chave em inglês (Keywords): Purification, Zeolites, Oligosaccharides, Enzymatic
Synthesis, Fixed-Bed column

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho
Eliana Setsuko Kamimura
Marlei Barboza Passoto
Maria Isabel Rodrigues

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

Prof^a. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
ZEA/FZEA/USP

Prof. Dr. Marlei Barboza Passoto
DEQ/UFSCAR

Prof^a. Dra. Maria Isabel Rodrigues
DEA/FEA/UNICAMP

**Aos meus pais, Erno e Tânia
À minha irmã Kátia.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos.

Ao Prof. Francisco Maugeri agradeço pela orientação, pela confiança, pelos desafios, pelos ensinamentos e apoio durante todo este período.

À banca examinadora, Prof^a. Eliana Kamimura, Prof^a. Maria Isabel e Prof. Marlei Passoto, pela atenção, sugestões e valiosas correções.

À Fapesp pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Erno e Tânia, devo muito a vocês do que sou hoje e de tudo que conquistei, sem vocês não concluiria mais esta etapa da minha vida, obrigado pelo apoio incondicional, pelo estímulo, paciência, muita paciência....., amor, carinho, compreensão, pelas palavras de incentivo, enfim por tudo que vocês representam na minha vida. Sem vocês não alcançaria mais esta vitória. Obrigada por tudo, amo vocês!!!!

À Kátia (manexxx), apesar da distância, sempre "presente". Sempre dando muito apoio, estimulando nas horas difíceis, com palavras amigas. Foi muito importante poder contar contigo neste período. Te adoro!!!!

Aos meus amigos e companheiros do LEB, Abraão, Angélica, Bernardo, Daniel, Danilo, Eliane, Elizama, Geraldo, Gui Lopes, Lílian Albertini, Lílian Saty, Mônica, Pedro, Saartje obrigada pelos momentos agradáveis de convivência, pela paciência e por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Fifa e a Saartje, obrigada pela atenção, compreensão e ajuda com valiosas sugestões e soluções.

Aos meus amigos, Lu, Vanessa, Tati, Camila, Gi, Gre, Camilinha, Bia, Machado, Otávio, Dani, Cláudio, Caiçara, Losi, Gustavo, Adri, Eli, Daniel, Leila, Eduardo, Milene, Rodrigo, Veri, Moribe, Nelisa, Gustavo, CD, Cláudia, Fabi, Klícia e Analice amigos de todas as horas, obrigado por todos esses momentos inesquecíveis, pela amizade sincera.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram e apoiaram para a conclusão desta dissertação.

Obrigada por tudo!!!!

Raquel C. Kuhn

Sumário

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Nomenclatura.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Oligossacarídeos	4
2.1.1. Propriedades	4
2.2. Efeitos Prebióticos	5
2.3. Produção de Oligossacarídeos	7
2.3.1. Produção enzimática de oligossacarídeos	10
2.3.1.1. Enzima β -frutofuranosidase	11
2.3.1.2. Enzima frutossiltransferase.....	11
2.3.2. Aplicação industrial dos frutooligossacarídeos.....	12
2.4. <i>Rhodotorula sp.</i>	13
2.5. Zeólitas	14
2.5.1. Definição e Propriedades	14
2.5.2. Estrutura	15
2.5.3. Aplicação	16
2.5.4. Zeólitas X e Y	16
2.6. Adsorção	17
2.7. Separação de Açúcares com Zeólitas.....	18
2.8. Separação de Oligossacarídeos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Microrganismo	23
3.2. Produção da Enzima.....	23
3.2.1. Obtenção do Inóculo	23
3.2.2. Fermentação.....	24
3.2.2.1. Clarificação do Meio.....	25
3.2.3. Recuperação da Enzima.....	25

3.3. Medida da Atividade Enzimática	26
3.3.1. Determinação de Açúcares	26
3.4. Síntese dos Oligossacarídeos.....	27
3.5. Zeólita.....	27
3.6. Preparo da Zeólita	27
3.6.1. Troca Iônica.....	28
3.7. Metodologia de Resposta a Pulsos Cromatográficos	29
3.8. Separação dos Açúcares	30
3.9. Influência da Granulometria de Partícula na Separação dos Açúcares	31
3.10. Determinação de Carboidratos por Cromatografia de Íons	31
3.10.1. Análise Cromatográfica.....	31
3.10.2. Preparo da Fase Móvel.....	31
3.10.3. Identificação e Quantificação das Amostras.....	32
3.10.4. Injeção das Amostras no Sistema HPLC-PAD	32
3.11. Planejamento Experimental	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Produção da Enzima.....	35
4.1.1. Fermentação.....	35
4.1.2. Recuperação da Enzima.....	35
4.2. Síntese dos Oligossacarídeos.....	36
4.3. Ensaio Preliminares na Separação dos Açúcares	37
4.3.1. Testes iniciais para definição do diâmetro de partícula	37
4.4. Planejamento Experimental Fracionário.....	41
4.5. Separação de Açúcares com Duas Colunas em Série.....	51
4.6. Separação de Açúcares com Três Colunas em Série	54
4.7. Comparação entre as Eficiências de Separação.....	56
5. CONCLUSÕES.....	59
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. ANEXOS.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Composição do meio GYMP.....	23
Tabela 2:	Composição do meio de cultura para obtenção do inóculo.....	24
Tabela 3:	Composições aproximadas dos substratos industriais.....	24
Tabela 4:	Composição da zeólita Y.....	27
Tabela 5:	Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário 2^{4-1} para eficiência de separação de açúcares.....	34
Tabela 6:	Matriz do delineamento experimental 2^{4-1} para verificar a eficiência na separação de açúcares.....	34
Tabela 7:	Atividade enzimática durante a fermentação da <i>Rhodotorula</i> sp.....	35
Tabela 8:	Concentração de açúcares após a síntese enzimática.....	36
Tabela 9:	Valores reais das variáveis estudadas e eficiência de separação dos açúcares em coluna de leito fixo.....	42
Tabela 10:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligos e glicose.....	43
Tabela 11:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligos e frutose.....	43
Tabela 12:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligos e sacarose.....	44
Tabela 13:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre glicose e frutose.....	44
Tabela 14:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre glicose e sacarose.....	45
Tabela 15:	Efeito das variáveis na eficiência de separação entre frutose e sacarose.....	45
Tabela 16:	Eficiência de separação (ES) dos açúcares com etanol 50% em coluna.....	46
Tabela 17:	Eficiência de separação dos açúcares com etanol 60%, T= 50°C e V= 1mL.....	50
Tabela 18:	Eficiência de separação entre açúcares com duas colunas em série.....	52
Tabela 19:	Eficiência de separação dos açúcares com duas colunas em série T= 50°C, v = 0,08 mL.min ⁻¹ , V= 1 mL, E(%)= 60.....	53
Tabela 20:	Eficiência de separação com três colunas em série variando a vazão.....	54
Tabela 21:	Eficiência de separação entre açúcares com três colunas em série T= 50°C, v = 0,08 mL.min ⁻¹ , V= 1 mL, E(%)= 60.....	56

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos frutooligossacarídeos A: kestose, B: nistose e C: frutofuranosilnistose (PASSOS & PARK, 2003).....	9
Figura 2: Reação de formação dos FOS, adaptado de HICKE <i>et al.</i> (1999).....	11
Figura 3: <i>Rhodotorula</i> sp. (Fonte: Laboratório de Engenharia de Bioprocessos).....	13
Figura 4: Estrutura da zeólita Y.....	15
Figura 5: Montagem da separação dos açúcares em leite de zeólita Y.....	30
Figura 6: Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲), com zeólita de diâmetro de partícula entre 125-149 μm, $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 20\%$..	38
Figura 7: Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲) com zeólita de diâmetro de partícula entre 250-297 μm, $v = 0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$.	39
Figura 8: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com zeólita de diâmetro de partícula de 250-297 μm, concentração inicial de açúcares de 250 g/L, $v = 0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$	40
Figura 9: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com zeólita de diâmetro de partícula de 177-210 μm, com concentração inicial de açúcares de 200 g/L, $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 40^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$	41
Figura 10: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,06 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	47
Figura 11: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	47
Figura 12: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	48
Figura 13: Eficiência de separação utilizando etanol 50% (■) e etanol 60%(▨).....	48
Figura 14: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) a 45°C	49
Figura 15: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,06 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, etanol 60% e 50°C	50
Figura 16: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, etanol 60% e 50°C	50

Figura 17: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de 0,1 mL.min ⁻¹ , etanol 60% e 50°C.....	51
Figura 18: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com duas colunas em série, com vazão de 0,06 mL.min ⁻¹	52
Figura 19: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com duas colunas em série, com vazão de 0,08 mL.min ⁻¹	53
Figura 20: Montagem experimental das colunas em série.....	54
Figura 21: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com três colunas em série, com vazão de 0,06 mL.min ⁻¹	55
Figura 22: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com três colunas em série, com vazão de 0,08 mL.min ⁻¹	55
Figura 23: Eficiência de separação utilizando etanol 50% com uma coluna (■), etanol 60% com uma coluna (▣), etanol 60% com duas colunas (▢) e etanol 60% com três colunas (▤), T= 50°C, v = 0,08 mL.min ⁻¹ , V= 1 mL.....	58
Figura 24: Ensaio 1. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	71
Figura 25: Ensaio 2. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	71
Figura 26: Ensaio 3. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	72
Figura 27: Ensaio 4. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	72
Figura 28: Ensaio 5. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	73
Figura 29: Ensaio 6. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	73
Figura 30: Ensaio 7. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	74
Figura 31: Ensaio 8. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	74
Figura 32: Ensaio 9. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	75
Figura 33: Ensaio 10. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	75
Figura 34: Ensaio 11. Separação de oligos(●), glicose(□), frutose(■) e sacarose(▲).....	76
Figura 35: Cromatograma dos padrões 30% de glicose (G), frutose (F), sacarose (GF), kestose (GF ₂), nistose (GF ₃) e frutofuranosilnistose (GF ₄).....	77
Figura 36: Cromatograma da síntese de 72 horas dos frutooligossacarídeos.....	77

NOMENCLATURA

μ - primeiro momento

σ^2 - segundo momento

n – número da fração

t – tempo

C – concentração do componente na fração

E - concentração de etanol (%)

v - velocidade de escoamento ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)

V - volume injetado na coluna (mL)

T - temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são considerados ingredientes naturais de alimentos devido aos efeitos benéficos na proliferação de bifidobactérias no cólon humano, sendo classificados como prebióticos. Estudos recentes demonstram que a separação cromatográfica de monossacarídeos e misturas de dissacarídeos pode melhorar através da utilização de zeólitas Y, sendo também promissoras na separação de oligossacarídeos. Neste estudo, colunas com zeólitas foram utilizadas na separação de oligossacarídeos. A enzima produtora dos frutooligossacarídeos foi isolada de *Rhodotorula* sp., produzindo seletivamente GF₂ (kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (frutofuranosilnistose). O rendimento de frutooligossacarídeos produzidos foi de 52% quando foi utilizada sacarose 50% como substrato. A separação dos frutooligossacarídeos foi realizada através de coluna empacotada com zeólitas Y trocadas com íons Ba²⁺. A eficiência de separação foi utilizada como critério para caracterizar a separação. Efeitos de temperatura (40°C a 50°C), quantidade de amostra injetada (1 a 3 mL), vazão (0,08 a 0,12 mL.min⁻¹) e composição do desorvente (etanol 40 a 60%) foram analisados, através de um planejamento experimental fracionário, onde a vazão se mostrou significativa. O estudo de separação dos açúcares demonstrou que a condição mais favorável para a separação foi com duas colunas em série com etanol 60% como desorvente, temperatura de 50°C, vazão de 0,08 mL.min⁻¹ e quantidade de amostra injetada de 1 mL. Os valores de eficiência de separação foram de 0,60 para oligossacarídeos e glicose, 1,00 para oligossacarídeos e frutose, 0,22 para oligossacarídeos e sacarose, 0,43 para glicose e frutose, 0,82 para glicose e sacarose e 1,23 para frutose e sacarose.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are nowadays considered natural food ingredients because of their beneficial effects in proliferating bifidobacteria in human colon; FOS are classified as prebiotics. Some recent studies show that the chromatographic separation of monosaccharides and a mixture of the disaccharides can be improved by using Y-zeolites, being promising in the separation of oligosaccharides. In this study, a column packed with zeolite was used to study the separation of oligosaccharides. The enzyme, which produces FOS from sucrose, was isolated from *Rhodotorula* sp., produced selectively GF₂ (kestose), GF₃ (nystose) and GF₄ (frutofuranosyl nystose). The final yield of FOS was 52% when 50% sucrose was used as substrate. For the separation of fructooligosaccharides was used column packed with Ba²⁺ -exchanged Y zeolites. Efficiency of separation was used as a criterion to characterize the effectiveness of the separation. Effects of temperature (40°C a 50°C), amount of mixture injection (1 a 3 mL), flow rate (0,08 a 0,12 mL.min⁻¹) and desorbent composition (ethanol 40 a 60%) were investigated, the according to a fractionary factorial design; the flow rate was a significant factor under the response of efficiency of separation. The study of separation of sugars showed that the most favorable conditions for this separation were with utilization of two columns in series with ethanol 60% as desorbent, temperature of 50°C, flow rate of 0,08mL.min⁻¹ and amount of mixture injection of 1 mL. The values for the separation efficiency were 0,60 for oligosaccharides-glucose, 1,00 for oligosaccharides-fructose, 0,22 for oligosaccharides-sucrose, 0,43 for glucose-fructose, 0,82 for glucose-sucrose and 1,23 for fructose-sucrose.

1. INTRODUÇÃO

A primeira geração de alimentos funcionais foi constituída de suplementos de cálcio e vitaminas, sendo reconhecidamente benéficos para a saúde. Nos últimos anos, um grande número de alimentos funcionais têm sido introduzido no mercado, sendo que a maioria deles possuem ingredientes com características funcionais, ou seja, aquele aditivo que exerce um efeito positivo para a microbiota intestinal, além de possuir o caráter nutricional, como os probióticos, e mais recentemente, os prebióticos (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Inicialmente grande parte dos estudos sobre alimentos funcionais visava o emprego de alimentos probióticos, alimentos que contêm microrganismos vivos capazes de colonizar o cólon. Mas a taxa de sobrevivência destes microrganismos às condições do sistema digestivo era baixa, dificultando a colonização do cólon. Na década de 80 foi observado que muitos oligossacarídeos alcançavam o cólon humano e animal sem ter sofrido degradação, tornando-se fonte de carbono para as bifidobactérias. Neste caso, esses alimentos são chamados de prebióticos.

Enquanto alguns peptídeos, proteínas e certos lipídeos são prebióticos em potencial, os carboidratos não digeríveis, também têm recebido esta classificação nos últimos anos. Grande atenção tem sido dada aos oligossacarídeos, em especial aos frutooligossacarídeos, porque além da possibilidade de melhorar e gerar benefícios à saúde, estes se apresentam como uma alternativa para formulações de alimentos em substituição a outros açúcares (SANGEETHA *et al.*, 2005; ZIEMER & GIBSON, 1998).

Os frutooligossacarídeos são classificados como prebióticos, porque além de não serem hidrolisados e nem absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal, eles promovem de forma seletiva o crescimento e estimulam a atividade metabólica de bactérias benéficas à saúde, sendo o crescimento de bifidobactérias considerado o principal objetivo dos prebióticos. São conhecidos vários tipos de oligossacarídeos não digeríveis, dentre eles os frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, oligossacarídeos da soja e alguns glucooligossacarídeos, os quais são reconhecidamente prebióticos (O`SULLIVAN, 1996).

Os frutooligosacarídeos são uma das classes de oligossacarídeos, sendo produzidos por enzimas microbianas e plantas que possuem atividade de transfrutossilação. Essas enzimas são obtidas de fungos, dentre eles, o *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus phoenicis* e *Fusarium spp* (FERNÁNDEZ *et al.* 2004; SANGEETHA *et al.* 2005) e leveduras, como a *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Aureobasidium*. A enzima para a síntese dos frutooligosacarídeos pode também ser obtida de plantas dentre elas a alcachofra de Jerusalém, beterraba, cebola e aspargo (YUN, 1996).

Geralmente os xaropes de frutooligosacarídeos obtidos possuem quantidades de glicose e sacarose, apresentando rendimento de frutooligosacarídeos entre 55-60%, portanto, torna-se necessário um processo de separação para a purificação destes açúcares. Um maior rendimento de frutooligosacarídeos é obtido quando são utilizadas duas enzimas simultaneamente (glicose isomerase e glicose oxidase), onde a glicose oxidase remove a glicose que age como inibidor competitivo durante a conversão dos frutooligosacarídeos (YUN & SONG, 1993) .

Estudos têm demonstrado que as zeólitas, aluminossilicatos cristalinos com elementos dos grupos IA e IIA, adsorvem frutose seletivamente em misturas de glicose e frutose (BUTTERSACK *et al.*, 1993; CHENG & LEE, 1992; CHING *et al.*, 1987; CHING & RUTHVEN, 1988; HO *et al.*, 1987; MARTINELLI *et al.*, 2000; SCHÖLLNER *et al.*, 1993), com desempenho similar às resinas de troca iônica, com a vantagem de apresentarem menor custo. Devido as suas propriedades adsorptivas e ao conhecimento da estrutura e composição, as zeólitas podem ser utilizadas na recuperação de açúcares (SILVA, 1998). Sendo portanto uma alternativa para a purificação de açúcares aumentando e disponibilizando a oferta do produto no mercado.

O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp vem, há vários anos, trabalhando com a purificação de bioprodutos, principalmente açúcares, através da utilização de zeólitas, podendo-se citar os trabalhos realizados por BURKERT (2003), LOURENÇO (2004) e SANTOS (2004).

Tendo em vista que o valor comercial dos oligossacarídeos aumenta com a pureza, torna-se interessante a recuperação dos produtos da ação da enzima obtida da *Rhodotorula sp.*, utilizando-se técnicas cromatográficas, obtendo-se produtos de elevada pureza, a partir de

uma matéria-prima de menor custo (sacarose), produtos de alto valor comercial, com boas perspectivas econômicas.

Dentro deste contexto, os objetivos principal e específicos deste trabalho foram:

- ✓ Desenvolver uma metodologia para separar os frutooligossacarídeos dos mono e dissacarídeos presentes na mistura de açúcares, através da utilização de colunas de leito fixo de zeólitas;
- ✓ Produzir a enzima utilizada na síntese dos frutooligossacarídeos através de fermentação submersa com a *Rhodotorula* sp.;
- ✓ Sintetizar os frutooligossacarídeos através de solução de sacarose 50%;
- ✓ Definir o diâmetro de partícula da zeólita Baylith WE 894 utilizada como adsorvente na coluna cromatográfica;
- ✓ Estudar a melhor separação dos oligossacarídeos presentes na mistura de açúcares, através da utilização de um planejamento fracionário 2^{4-1} ; onde as variáveis estudadas foram, a concentração de etanol, vazão de alimentação da coluna, volume injetado e a temperatura;
- ✓ Estudar a eficiência de separação com as melhores condições obtidas com uma coluna através de duas e três colunas em série.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OLIGOSSACARÍDEOS

Desde a década de 80 há um grande interesse por alimentos funcionais, alimentos capazes de melhorar a saúde, a performance física ou a capacidade mental, além de possuírem valor nutricional (BEKERS *et al.*, 2004). Nos últimos anos, os oligossacarídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores, porque ao lado dos usos tradicionais, como fonte de energia e adoçante, podem ser utilizados como novos ingredientes funcionais, apresentando grande potencial para melhorar a qualidade de muitos alimentos.

A partir da década de 80 houve um aumento da demanda pelo consumo de alimentos saudáveis, utilizando nestes alimentos açúcares alternativos, dentre eles alguns oligossacarídeos como isomaltoligossacarídeos, oligossacarídeos da soja e frutooligossacarídeos (YUN, 1996). São conhecidos e produzidos comercialmente 12 classes de oligossacarídeos, dentre elas, galactooligossacarídeos, lactulose, frutooligossacarídeos, isomaltoligossacarídeos, maltooligossacarídeos, oligossacarídeos de soja, gentiooligossacarídeos.

2.1.1. Propriedades

Os oligossacarídeos são solúveis em água, levemente doces, possuem de 0,4 a 0,6 vezes o poder de doçura da sacarose, possuindo valor calórico baixo, esta propriedade é benéfica naqueles alimentos que necessitam de restrição de açúcares. A doçura dos frutooligossacarídeos depende da estrutura química e massa molecular do oligossacarídeo presente e dos níveis de mono e dissacarídeos presentes na mistura (YUN, 1996).

Segundo Yun (1996), o gosto doce dos frutooligossacarídeos é muito similar ao da sacarose, quando comparada com a doçura da 1-kestose, nistose e 1^F-frutofuranosilnistose sendo esta de 31%, 22% e 16%, respectivamente comparada com uma solução 10% de sacarose.

Os frutooligossacarídeos são altamente higroscópicos, tornando-se difícil sua aplicação em alimentos liofilizados, que necessitam ser armazenados por longos períodos; sua viscosidade e estabilidade térmica são relativamente maiores que a da sacarose nas mesmas concentrações. Essas propriedades são utilizadas em produtos alimentícios como iogurtes, bebidas funcionais, sorvetes e biscoitos. Mesmo não existindo muitos estudos comparando as propriedades físico-químicas dos frutooligossacarídeos à sacarose, acredita-se que estes açúcares são semelhantes em muitas propriedades como solubilidade, temperatura de congelamento e ponto de ebulição (ANTOSOVÁ & POLAKOVIC, 2001; YUN, 1996).

O maior interesse na utilização dos oligossacarídeos ocorre devido aos benefícios das suas propriedades fisiológicas. Muitos oligossacarídeos não são digeridos pelo organismo humano, não sendo utilizados como energia para o corpo humano. E esta propriedade confere a possibilidade de sua utilização em alimentos com menor teor de açúcares e produtos diet, podendo ser consumido por diabéticos. Os frutooligossacarídeos também são considerados não carcinogênicos (YUN, 1996).

2.2. EFEITOS PREBIÓTICOS

Nos últimos anos, tem sido considerado alimento funcional aquele aditivo que exerce um efeito positivo para a microbiota intestinal, como os probióticos e mais recentemente tem se dada atenção aos prebióticos (ZIEMER & GIBSON, 1998). Inicialmente os estudos eram com alimentos probióticos, alimentos que contêm microrganismos vivos capazes de colonizar o cólon, como os *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Bifidodactéria* spp. (HARTEMINK, 1997).

Dentre os benefícios dos probióticos podem-se destacar o restabelecimento da microflora intestinal, aumento da resposta do sistema imunológico, restabelecimento da absorção de cálcio, síntese de vitaminas e a redução da intolerância à lactose (ZIEMER & GIBSON, 1998). Os microrganismos probióticos também são capazes de melhorar a saúde humana da seguinte forma: melhoram o metabolismo de proteínas e vitaminas; previnem a constipação; têm ação antibiótica no intestino, prevenindo a colonização por patógenos; reduzem os riscos de câncer de cólon (ARUNACHALAN, 1999; MODLER *et al.*, 1990).

Acreditava-se que todos os alimentos não digeridos eram excretados nas fezes, mas após alguns anos de estudos, observou-se que alguns destes alimentos eram fermentados por certos microrganismos da microbiota intestinal (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996). Apesar de alguns peptídeos, proteínas e lipídeos serem prebióticos, foram os oligossacarídeos não digeríveis (principalmente os frutooligossacarídeos) que receberam a atenção dos pesquisadores (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Devido às dificuldades encontradas na administração oral de alimentos probióticos (baixas taxas de sobrevivência), os alimentos prebióticos tornaram-se uma alternativa atraente de alimentos funcionais. É importante observar que não somente os microrganismos probióticos são capazes de metabolizar estes alimentos funcionais, em certos casos, patógenos também o são. Entretanto, o comportamento destas culturas em um ecossistema competitivo como o cólon mostra que os microrganismos probióticos se desenvolvem muito melhor na presença destes alimentos do que os patógenos, gerando assim um efeito prebiótico (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Nos últimos anos, tem sido estudada a capacidade dos oligossacarídeos de promoverem a proliferação das bifidobactérias no cólon, pois são resistentes as enzimas digestivas. Essas bactérias causam benefícios à saúde, dentre eles, a proteção contra infecções gastrointestinais, redução do pH intestinal pela assimilação de açúcares, supressão de bactérias patogênicas e putrefativas, produção de vitaminas, ativação da função intestinal, auxílio à digestão e estimulação do sistema imunológico (MIZOTA, 1996). Conseqüentemente, os oligossacarídeos têm sido descritos como prebióticos, pois possibilitam o crescimento da microflora benéfica. Estudos têm demonstrado que o aumento do número de bifidobactérias no cólon ocorre através de um consumo diário superior a 15g (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996).

Os oligossacarídeos prebióticos, como os frutooligossacarídeos são fermentados no cólon onde promovem o crescimento da população de bactérias associadas com benefícios a saúde, devido ao bom funcionamento do cólon. Esta estimulação seletiva ocorre porque os oligossacarídeos são fermentados pelas bactérias benéficas ao organismo e não utilizados pelas bactérias potencialmente patogênicas. As bactérias benéficas incluem as bifidobactérias, *Lactobacilli* e eubactérias, *Staphylococci*, *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Veillonella* e certos clostrídios são considerados prejudiciais. O crescimento destas bactérias

benéficas é desejável porque controla o crescimento de bactérias invasivas e prejudiciais (FLICKINGER, 2003).

Em estudos realizados por Spiegel *et al.* (1994) e Rycroft *et al.* (2001) foi observado que houve maior proliferação das bifidobactérias no organismo com o aumento do consumo de oligossacarídeos. Dentre os efeitos e benefícios do consumo de oligossacarídeos inclui-se a produção de ácidos graxos voláteis, diminuição do pH intestinal, decréscimo da produção de substâncias putrefativas do intestino e aumento das bifidobactérias (HIDAKA *et al.*, 1986).

Os oligossacarídeos vêm sendo reconhecidos como fibras solúveis, segundo estudo realizado por Cherbut (2002). Estudos realizados por Sangeetha *et al.* (2005), demonstram que a média de frutooligossacarídeos excretados corresponde a 90% da dose consumida, ou seja, eles atuam como fibras não sendo absorvidos durante a digestão.

Devido à falta de digestibilidade no intestino e sua fermentação no cólon, os frutooligossacarídeos possuem efeito laxativo, se consumidos em grandes quantidades (SPIEGEL *et al.*, 1994). Devido a possíveis desconfortos intestinais causados pelos carboidratos não digeríveis, recomenda-se um consumo diário de 20 a 30g de frutooligossacarídeos (ROBERFROID & DELZENNE, 1998).

Vários são os estudos realizados utilizando oligossacarídeos na dieta demonstrando seus efeitos benéficos. Segundo Yamashita *et al.* (1984), citado por Williams & Jackson (2002) num estudo realizado durante duas semanas foi administrado 8g/dia de frutooligossacarídeos, sendo observada uma diminuição de 10% no colesterol LDL, comparada com um grupo controle que utilizou sacarose na dieta. Hidaka *et al.* (1991), observou efeitos semelhantes de redução de colesterol quando foram administrados também 8g/dia de frutooligossacarídeos, sendo que o estudo foi realizado durante 5 semanas.

2.3. PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Os frutooligossacarídeos podem ser divididos em dois grupos do ponto de vista comercial. O primeiro grupo é preparado a partir da hidrólise enzimática da inulina pela enzima inulinase através da sacarose (BORGES, 2001) e consiste de unidades lineares de frutossil com

ou sem uma unidade final de glicose. Este processo ocorre amplamente na natureza, e esses oligossacarídeos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas (ROBERFROID, 1993), principalmente em alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo e tomate (SPIEGEL, 1994; YUN, 1996).

A produção e quantidade de enzima produtora de frutooligossacarídeos em plantas variam de acordo com as condições sazonais, sendo que o rendimento destas enzimas é relativamente pequeno (ANTOSOVÁ & POLAKOVIC, 2001).

O segundo grupo é preparado por reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose e consiste tanto de cadeias lineares quanto de cadeias ramificadas de oligossacarídeos (BORGES, 2001).

Altas concentrações de sacarose são recomendadas para que se obtenha um alto rendimento de frutooligossacarídeos produzidos. O aumento da concentração do substrato é realizado porque desta maneira aumenta-se a atividade de transfrutossilacção e hidrólise das enzimas quando a β -frutofuranosidase é utilizada na reação (ANTOSOVÁ & POLAKOVIC, 2001).

Os frutooligossacarídeos representam a maior classe de oligossacarídeos bifidogênicos em termos de volume de produção. São produzidos a partir de sacarose, usando a atividade de transfrutossilacção da enzima. Estes frutooligossacarídeos formados neste processo possuem de duas a quatro ligações β (1-2) frutossil ligadas à glicose, sendo eles a kestose, 1-nistose e a frutofuranosilnistose (Figura 1). A glicose e pequenas porções de frutose são formadas como produtos da reação de transfrutossilacção, sendo que estes açúcares podem ser removidos da mistura através de processos cromatográficos para a produção de frutooligossacarídeos de elevada pureza.

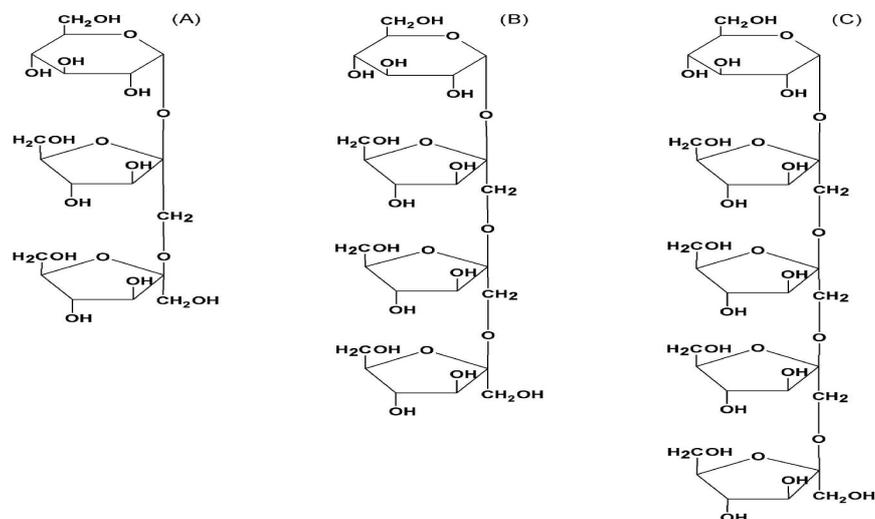


Figura 1: Estrutura química dos frutooligossacarídeos A: kestose, B: nistose e C: frutofuranosilnistose (PASSOS & PARK, 2003).

Diversos microrganismos têm sido reportados como produtores de frutooligossacarídeos, utilizando a enzima frutossiltransferase e sacarose como substrato, dentre eles, o *Aspergillus oryzae* CFR 202 (SANGEETHA *et al.*, 2002), *Aspergillus japonicus* (CHIEN *et al.*, 2001), *Aspergillus niger* AS 0023 (L'HOCINE *et al.*, 2000), *Aureobasidium pullulans* CFR 77 (SANGEETHA *et al.*, 2004), *Bacillus macerans* EG-6 (PARK *et al.*, 2001), *Zimomonas mobilis* (BEKER *et al.*, 2002), *Penicillium citrinum* (HAYASHI *et al.*, 2000).

Os rendimentos de produção de frutooligossacarídeos variam de 24 a 61%, sendo que rendimentos de 61% foram encontrados utilizando *Aspergillus japonicus* com altas concentrações de sacarose (40%) como substrato (SANGEENTHA *et al.*, 2005). Rendimentos maiores, em torno de 90-98% foram encontrados quando duas enzimas foram utilizadas (β -frutofuranosidase e glicose oxidase) na conversão dos frutooligossacarídeos (SHEU *et al.*, 2001).

Diversos são os trabalhos encontrados onde se utilizam bactérias e fungos para a produção de frutooligossacarídeos dentre eles, *Bacillus macerans*, que produz frutooligossacarídeos com rendimento de 33%, utilizando sacarose 50% como substrato. A bactéria *Zimomonas mobilis* também tem sido reportada como produtora de frutooligossacarídeos, através da enzima levanasacarase, que produz uma mistura de

frutooligossacarídeos (1-kestose, 6-kestose, neokestose e nistose) com um rendimento de 24-32% (BEKER *et al.*, 2002).

Sangeetha *et al.* (2004) utilizou frutossiltransferase extracelular de *Aureobasidium pullulans*, obtendo um rendimento de 56% de frutooligossacarídeos a partir de uma solução de 55% (p/v) de sacarose após 24 h de reação, a 55 °C e pH igual a 5,5.

Alguns fungos, principalmente os *Aspergillus* sp., são conhecidos como produtores de frutossiltransferases. O *Aspergillus niger* AS 0023 vem sendo utilizado para a produção de frutooligossacarídeos, com rendimentos de 54% (L'HOCINE *et al.*, 2000).

As frutossiltransferases têm sido extensamente caracterizadas. Em geral as enzimas derivadas de microrganismos são maiores em tamanho e mais estáveis em relação à temperatura que as enzimas derivadas de plantas. Um grande número de pesquisadores tem estabelecido que a temperatura ótima para a atividade de frutossiltransferase é de 50 - 60°C e o pH de 5 - 6,5 com exceção das enzimas do *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis* e *Scopulariosis brevicaulis*, para os quais o ótimo de pH é entre 8 - 9 (ANTOSOVÁ & POLAKOVIC, 2001; YUN, 1996).

2.3.1. Produção Enzimática de Oligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos geralmente compostos de 1-kestose, nistose e 1-β-frutofuranosilnistose, são produzidos pela atividade de transfrutossililação da β-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) de microrganismos e plantas (Figura 2). Entretanto alguns pesquisadores têm definido estas enzimas como frutossiltransferases (EC 2.4.1.9), enfatizando a produção de frutooligossacarídeos através da atividade de transfrutossililação e para distingui-las das enzimas hidrolíticas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

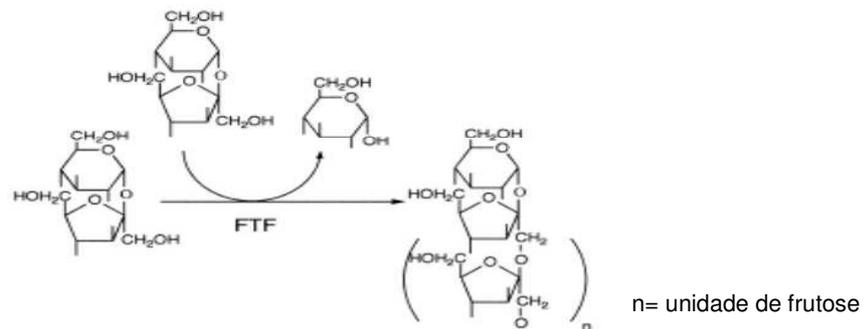


Figura 2: Reação de formação dos FOS, adaptado de HICKE *et al.* (1999).

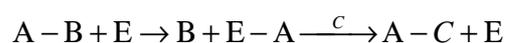
Segundo Yun (1996), a enzima é uma β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) quando possui atividade de transfrutossilacção em altas concentrações de sacarose, já a frutossiltransferase é a enzima que possui atividade de transfrutossilacção em baixas concentrações do substrato sacarose.

2.3.1.1. Enzima β -frutofuranosidase

A β -frutofuranosidase (invertase) é uma enzima que hidrolisa a sacarose principalmente em glicose e frutose, mas dependendo da sua origem pode exibir atividade de transfrutossilacção em condições apropriadas de reacção. Existem dois caminhos para a produção de frutooligossacarídeos através da acção da β -frutofuranosidase em sacarose: por hidrólise reversa e transfrutossilacção.

2.3.1.2. Enzima Frutossiltransferase

A frutossiltransferase catalisa a transferência de um grupo frutossil para a molécula de sacarose ou até mesmo para um frutooligossacarídeo de cadeia curta quando um frutooligossacarídeo de cadeia mais longa, com mais de uma unidade frutossil é formado, como mostrado no esquema:



Onde: A – B : doador (sacarose ou frutooligossacarídeos), E: enzima, C: aceptor (sacarose ou frutooligossacarídeos), A – C: produto (frutooligossacarídeos com uma molécula frutossil a mais que o aceptor).

As frutossiltransferases apresentam uma pequena afinidade com a água como aceptor, significando que a atividade de hidrólise é muito pequena. Foi demonstrado por inúmeros autores que as enzimas de diferentes plantas possuem tanto a atividade de hidrólise, como a de transfrutossililação.

Entretanto, a nomenclatura das enzimas de origem microbiana que produzem frutooligossacarídeos não está totalmente definida. Alguns autores (HANG *et al.*, 1995; L'HOCINE *et al.*, 2000; YUN *et al.*, 1997) a definem como frutossiltransferase e outros (CHEN & LIU, 1996; CHIANG *et al.*, 1997; DUAN *et al.*, 1993; HAYASHI *et al.*, 1991) como β -frutofuranosidase.

L'Hocine *et al.* (2000) separou as duas enzimas, frutossiltransferases e β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* AS 0023. A frutossiltransferase catalisou exclusivamente reações de transferência de frutossil, enquanto a β -frutofuranosidase não mostrou qualquer atividade de transferência. Hayashi *et al.* (1991 e 1992) isolaram duas frutossiltransferases extracelulares e intracelulares, que não demonstraram nenhuma atividade hidrolítica. Entretanto deve-se levar em consideração que os microrganismos utilizados não foram os mesmos, não podendo chegar a uma conclusão precisa. Devido a isso a nomenclatura das enzimas produtoras de frutooligossacarídeos ainda não foi totalmente definida (ANTOSOVÁ & POLAKOVIC, 2001).

2.3.2. Aplicação Industrial dos frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos podem ser divididos em dois grupos, do ponto de vista comercial: o primeiro grupo é preparado da hidrólise enzimática da inulina. Este produto é comercializado como "Raftilose", produzido pela Orafti Ltda, da Bélgica, ou como "Frutafti", produzido pela Imperia-Suikner Unie, da Holanda.

O segundo grupo é preparado pela reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose. Este produto é produzido pela Meiji Seika Ltda (Japão) e comercializado como “Neosugar”, que corresponde a uma mistura de frutooligossacarídeos, cujos principais componentes são kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosilnistose (GF₄). Mais recentemente a Cheil Foods & Chemicals Co. na Korea produziu industrialmente os frutooligossacarídeos através de enzimas imobilizadas de *Aspergillus pullulans* (YUN, 1996). O “Actilight” é produzido e comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (HARTEMINK *et al.*, 1997; HIDAKA *et al.*, 1986).

2.4. RHODOTORULA SP.

Os fungos do gênero *Rhodotorula* pertencem ao filo Basidiomycota. Algumas linhagens podem produzir pseudomicélios, mas não produzem esporos sexuais, sendo consideradas “leveduras falsas” ou fungos imperfeitos. Apresentam células esféricas, ovóides ou alongadas (Figura 3). Muitas espécies produzem colônias laranjas ou rosadas, entretanto a pigmentação das colônias pode variar de amarelo a vermelho escuro, devido à presença de pigmentos carotenóides. Leveduras do gênero *Rhodotorula* podem causar colorações em alimentos devido à produção de pigmentos ou ao aparecimento de colônias pigmentadas.

Existem mais de trinta espécies de *Rhodotorula*, sendo que as mais comuns são *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa*. (BEUCHAT, 1978; KREGER-VAN RIJ, 1987). Linhagens de *Rhodotorula* podem ser isoladas de várias fontes, incluindo folhas, flores, atmosfera, solo e fontes marinhas (PITT *et al.*, 1999; ROSE *et al.*, 1969).

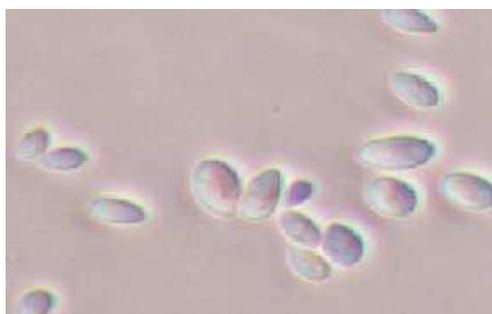


Figura 3: *Rhodotorula* sp. (Fonte: Laboratório de Engenharia de Bioprocessos).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* apresentam uma grande versatilidade com respeito aos requerimentos nutritivos, podendo crescer em resíduos industriais e dejetos de alimentos processados, meios à base de subprodutos agroindustriais de baixo custo (BUZZINI *et al.*, 2000; SQUINA, 2001).

2.5. ZEÓLITAS

2.5.1. Definição e Propriedades

O termo zeólita foi inicialmente utilizado para designar uma família de minerais naturais, que apresentam como propriedades particulares à troca de íons e a dessorção reversível de água (GIANNETTO, 1990).

Hoje, o termo engloba um grande número de minerais naturais e sintéticos que apresentam características comuns. São formados de um esqueleto cristalino formado pela combinação tridimensional de tetraedros TO_4 ($T = Si, Al, B, Ga, Ge, Fe, P, Co$) unidos entre si através de átomos de oxigênio comuns (GIANNETTO, 1990).

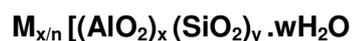
As zeólitas são normalmente cristalizadas através de géis alcalinos aquosos contendo porções de silício, alumínio e cátions. A cristalização é geralmente na temperatura de 60-200^oC. A natureza do produto é controlada por fatores cinéticos e pequenas mudanças nas condições podem alterar o produto (CATLOW, 1992).

As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos e hidratados, com elementos dos grupos IA e IIA, apresentam uma combinação de propriedades que as tornam interessantes para várias aplicações, têm se destacado como adsorventes devido ao caráter microporoso, a dimensão de poro uniforme, a elevada área específica, a adsorção seletiva baseada nas dimensões moleculares, as propriedades de troca iônica e a estabilidade térmica (acima de 500^oC) (MOSCOU, 1991).

2.5.2. Estrutura

As zeólitas são formadas por uma rede tridimensional de tetraedros de AlO_4 e SiO_4 , ligados entre si pelos quatro vértices de oxigênio em comuns, originando assim uma estrutura microporosa (BRECK, 1974). No tetraedro de silício cada íon tem sua carga +4 balanceada pelos quatro oxigênios e, portanto, este tetraedro é eletricamente neutro. Entretanto cada tetraedro de alumínio tem uma carga residual -1, já que o alumínio trivalente está ligado a quatro oxigênios, fazendo com que cada tetraedro de alumínio precise de uma carga +1 proveniente do cátion na estrutura para manter-se neutro. Este cátion é geralmente o sódio, que pode ser substituído por troca iônica.

Os tetraedros de silício e alumínio (unidades de construção primária da zeólita), combinam-se entre si formando unidades de construção secundária, que podem ser cubos, prismas hexagonais ou octaedros. Os tetraedros estão arranjados de tal maneira que as zeólitas apresentam uma estrutura aberta composta por canais ocupados por água e cátions (BHATIA, 1946) (Figura 4). A congregação das unidades de construção secundária resulta na estrutura final das zeólitas. A fórmula estrutural da zeólita é baseada na unidade cristalográfica da célula, a menor unidade da estrutura é representada pela fórmula estrutural (FLANIGEN, 1991):



Onde n é a valência do cátion M, w é o número de moléculas de água por célula, x e y o número de tetraedros por célula unitária, sendo que y/x varia entre 1 a 5.

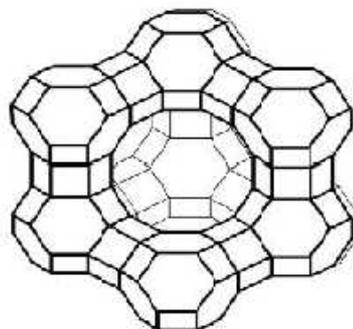


Figura 4: Estrutura da zeólita Y.

2.5.3. Aplicação

A estrutura de uma zeólita define sua aplicação industrial, tanto em processos físicos de separação e purificação como em processos químicos de refinação e petroquímica (GIANNETTO, 1990).

Aplicações importantes das zeólitas estão em processos de secagem, separação e purificação, sendo utilizadas para remover compostos orgânicos do ar, reduzir emissões de SO₂ (GUPTA *et al.*, 2003), na purificação de efluentes industriais, remoção de amônia (JORGENSEN, 2003), remoção de zinco aquoso (BADILLO-ALMARAZ *et al.*, 2003) e metais pesados. Podem ser utilizadas também, como catalisadores no processo de refino de petróleo e produção de petroquímicos, além de suporte para metais e reagentes ativos. São excelentes agentes dessecantes, tendo capacidade de adsorver até 25% de seu peso em água.

Podem ser utilizadas na separação de açúcares, apresentando desempenho similar as resinas de troca iônica. Apresentando-se promissoras na separação de oligossacarídeos, segundo estudo realizado por BURKERT (2003), indicando uma nova perspectiva para a separação destes açúcares.

As zeólitas β dealuminadas geralmente são utilizadas como adsorvente seletivo de carboidratos em solução aquosa, sendo o processo de adsorção reversível baseado no tamanho molecular e seletividade. Permitindo que a zeólita seja utilizada muitas vezes, entre os passos de adsorção e dessorção do processo, enfatizando o considerável valor econômico das zeólitas em aplicações de adsorção. As zeólitas são caracterizadas não só pela alta seletividade, mas também pela habilidade de separar substâncias com base na diferença do tamanho molecular e forma (BERENSMEIER & BUCHHOLZ, 2004).

2.5.4. Zeólitas X e Y

As zeólitas X e Y são similares em estrutura, entretanto elas distinguem-se das demais espécies de zeólitas por apresentarem características diferentes. A célula unitária é cúbica com grande dimensão, contendo 192 tetraedros de (Si,Al)O₄ (BRECK, 1974).

De acordo com Kärger & Ruthven (1991), as zeólitas X e Y formam o maior volume de poro entre as zeólitas e a diferença entre elas está na proporção Si/Al e na ordenação do silício e do alumínio nos tetraedros. Esta célula unitária é caracterizada por oito tetraedros truncados conectados por meio de dezesseis prismas hexagonais.

O número de íons de alumínio na célula unitária da zeólita X varia de 96 a 77 e na zeólita Y de 76 a 48, resultando em uma relação de Si/Al de 1 a 1,5 para a zeólita X e de 1,5 a 3 para a zeólita Y (BRECK, 1974).

Podem ser classificadas de acordo com o tamanho do poro, sendo que os diâmetros variam de 3 a 8 Å. As zeólitas X e Y são as que apresentam maior poro (6 a 8 Å). A razão entre silício e alumínio também considerada uma forma de classificação das zeólitas.

2.6. ADSORÇÃO

A adsorção é um fenômeno de transferência de massa que ocorre quando um soluto se liga a um adsorvente sólido através de forças intermoleculares, que podem ser fracas (adsorção física) ou fortes ligações químicas (adsorção química).

Segundo Brocklebank (1990), nos processos de adsorção a taxa que o soluto liga-se à superfície sólida deve exceder a taxa na qual o soluto deixa a superfície. Pode-se assumir que essas taxas são dependentes às concentrações do soluto na solução e na superfície do sólido. A análise da adsorção é baseada no equilíbrio, o qual é apresentado sob a forma de isotermas de adsorção.

A seletividade de adsorção das zeólitas, que requer adsorção preferencial de um componente de uma mistura, está baseada nas diferenças no equilíbrio de adsorção e nas taxas de adsorção ou na exclusão por tamanho (efeito de peneira molecular) (RUTHVEN, 1984).

O efeito de peneira molecular é causado por diferenças no tamanho e forma entre a abertura do cristal e a molécula de adsorbato. As zeólitas que atuam como peneiras têm poros

de tamanho uniforme (3 a 10 Å) que irão excluir completamente moléculas maiores que seu diâmetro (BRECK, 1974).

A forte adsorção pode ser explicada pela habilidade da molécula hóspede de maximizar a interação apolar com a superfície interna da zeólita, pela redução da hidratação e pela mudança na conformação (BUTTERSACK, 1996).

2.7. SEPARAÇÃO DE AÇÚCARES COM ZEÓLITAS

A separação cromatográfica de carboidratos com zeólitas tem sido introduzida em escala industrial a mais de dez anos. Estudos recentes demonstraram que a separação cromatográfica de monossacarídeos e misturas de dissacarídeos pode ser melhorada com a utilização de zeólitas Y contendo menos alumínio (BUTTERSACK *et al.*, 1993).

Hashimoto *et al.* (1983) desenvolveram um processo para produção de xaropes com alto teor de frutose (superior a 50%). A separação de glicose e frutose foi realizada através de um leito móvel empacotado com zeólitas, onde foi observado que a zeólita Y trocada com íons Ca^{2+} adsorvia preferencialmente frutose.

Ho *et al.* (1987) estudaram a adsorção de glicose e frutose através de duas resinas (Ca^{2+} Zerolit 225 SRC14 e Ca^{2+} Duolite C-204) e duas zeólitas (Ca-Y e Ca-X). A zeólita Ca-X não apresentou seletividade entre glicose e frutose, já a zeólita Ca-Y apresentou seletividade e capacidade semelhante as resinas Ca^{2+} . A zeólita Ca-Y apresentou a vantagem de uma menor resistência na transferência de massa que as resinas adsorventes.

Cheng & Lee (1992) estudaram a eficiência de separação de glicose e frutose através de zeólita Y, onde se definiu como parâmetros para o cálculo da eficiência de separação (ES), a temperatura, volume injetado, vazão de alimentação e troca iônica. A melhor separação foi obtida com a zeólita Ba-Y, sendo que, em ordem de eficiência de separação, tem-se: $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, com diâmetro de partícula de 20-40 mesh. Água deionizada foi utilizada como eluente, sendo que os ensaios foram realizados numa vazão de 2, 1,5, 1 e 0,5 mL/min. Em vazões mais baixas (0,5 e 1 mL/min) foram obtidas as melhores separações. Três níveis de temperatura foram utilizados, de 25, 40 e 60°C, sendo que os melhores resultados foram

encontrados a 40°C. A 60°C observou-se o escurecimento das amostras. O volume injetado na coluna variou de 1 a 8 mL, sendo que a melhor separação foi obtida com menores volumes de injeção.

Buttersack *et al.* (1993) estudaram a adsorção de sacarídeos com zeólita Y dealuminada ($\text{Si/Al} > 100$), os experimentos foram realizados em reator de mistura, contendo 1 g de zeólita e 3 mL de solução do açúcar em estudo (5-200 g/L), mantendo-se sob agitação por 20 h a 25°C. Foi observado que com a zeólita dealuminada o coeficiente de partição para frutose aumentou, comparado com a zeólita CaY de razão $\text{Si/Al} = 2,4$; mas não se observou seletividade para frutose, sendo sacarose, leucrose e outros dissacarídeos, adsorvidos preferencialmente.

Buttersack *et al.* (1996) estudaram a adsorção de sacarose, estaquiose, isomaltotriose e dextrana. Os resultados demonstram que a isomaltotriose apresentou grande afinidade e considerável capacidade de adsorção. A estaquiose, bem como a dextrana, demonstraram capacidade de adsorção comparáveis a da sacarose. Verificou-se também que a interação do polímero com o poro da zeólita depende da natureza das unidades do monômero e da seqüência destas unidades. Isto pode ser exemplificado pela comparação de monossacarídeos com oligo e polissacarídeos. A afinidade do dissacarídeo pode aumentar ou diminuir de acordo com a natureza da ligação glicosídica. A afinidade de dissacarídeos aumenta nesta ordem: glic $\beta(1-6)$ glic < glic $\beta(1-4)$ glic < glic $\alpha(1-4)$ glic < glic $\alpha(1-6)$ glic. A inulina, devido ao tamanho, foi completamente excluída da adsorção pelos poros da zeólita. A zeólita FAU pode adsorver seletivamente polímeros contendo ligações glicosídicas $\alpha(1-6)$, dentre eles, rafinose, estaquiose, isomaltotriose e dextrana, enquanto os polímeros formados por α , $\beta(1-4)$ e $\beta(1-6)$ são excluídos.

Silva (1998) estudou a adsorção de frutose utilizando zeólitas, verificando o efeito da troca iônica (Ca^{2+} , Ba^{2+}), razão Si/Al de zeólitas Y (1,77 e 2,59) e tempo de troca (5 min e 24 h). Observou que a zeólita Y_2 , com maior razão Si/Al , trocada com Ca^{2+} durante 24 h, apresentou maior capacidade de adsorção, sendo que a adsorção de frutose no meio contendo dextrana foi cerca de 60 % do valor da capacidade de adsorção de frutose pura em mesma concentração.

Martinelli *et al.* (2000) estudaram a separação de glicose e frutose utilizando zeólitas. Diferentes formas catiônicas (Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} e K^+) de zeólitas do tipo A e X foram testadas

quanto à adsorção de frutose. Zeólitas A e X na forma Ca^{2+} e Ba^{2+} foram utilizadas na adsorção de glicose, sendo que a zeólita Ca-X apresentou a menor capacidade de adsorção de glicose. Também foi realizado um ensaio em uma coluna de 53,5 cm de leito e 1,2 cm de diâmetro, contendo a zeólita Ca-X com tamanho de partícula de 0,25 a 1,00 mm, utilizando-se na alimentação frutose e glicose na concentração de 20 g/L, vazão de 1 mL/min e temperatura ambiente. A coluna foi alimentada até a saturação e após eluída com água deionizada. Foram obtidos coeficientes de partição para frutose e glicose de 0,369 e 0,242, respectivamente. Foi definida com seletividade a relação entre os coeficientes de partição de frutose e glicose, correspondente a 1,525.

Estudos realizados por Lorenzo (2004) selecionaram a melhor condição para a separação de glicose e frutose obtidos do leite de hidrólise, sendo que a condição em que se obteve a melhor separação para glicose e frutose na concentração de 250 g/L foi através da utilização de três colunas de zeólitas em série e etanol 15% como eluente, observou-se que quanto maior a concentração de etanol, melhor a separação. O volume total das três colunas foi de 117,9 cm³ e o pulso dado de 1 mL. Nestas condições, obtiveram-se frações de frutose de alto grau de pureza, obtendo-se 63,5% da frutose injetada praticamente pura na saída das colunas cromatográficas, e a eficiência da separação foi de 1,62.

Berensmeier & Buchholz (2004) estudaram a separação de isomaltose através de zeólitas β dealuminadas, com diferentes razões de Si/Al. Foram calculados alguns parâmetros como a capacidade de adsorção (q_i) e a constante do equilíbrio da adsorção (K_i) e para os dois parâmetros a zeólita com razão de Si/Al de 75 foi a que apresentou melhor afinidade na adsorção de isomaltose. Para a adsorção de múltiplos componentes, quanto maior a concentração de glicose na mistura, menor a afinidade da isomaltose pela zeólita. O mesmo foi observado para a glicose, quanto maior a concentração de isomaltose na mistura de açúcares, menor a afinidade da glicose pelo adsorvente.

2.8. SEPARAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Hidaka *et al.* (1988) sintetizou oligossacarídeos através da enzima de *Aspergillus niger* ATCC 20611, onde após 72 horas de síntese obteve rendimentos de glicose (33,4%), traços de frutose, sacarose (9%), GF₂ (17,3%), GF₃ (32%) e GF₄ (7,2%). A mistura de açúcares (20 mL)

foi adicionada numa coluna de carvão ativo (5 x 30) cm, após eluição de água destilada para remoção dos monossacarídeos e sacarose, a coluna foi sucessivamente eluída com 5, 10 e 20% de etanol para a separação dos frutooligossacarídeos.

Takeda *et al.* (1993) estudaram a purificação de 1-kestose através da fermentação de *Scopulariopsis brevicaulis*. O sobrenadante da fermentação foi utilizado onde glicose, frutose e proteínas foram retiradas através da adição de óxido de cálcio 0,1%, os precipitados formados foram retirados por filtração. A solução foi eluída em colunas de troca iônica, com aquecimento para a remoção dos sais. A solução dessalinizada foi concentrada até 70 Brix, onde a composição do xarope foi de 90% de 1-kestose, 4% de nistose e 6% de sacarose. O xarope foi dissolvido em metanol e evaporado através de baixa pressão. Após 5 dias no refrigerador foram obtidos cristais de 1-kestose com 94% de pureza.

Takahashi & Goto (1994) utilizaram um cromatógrafo rotatório anular contínuo para separar frutooligossacarídeos, removendo monossacarídeos e dissacarídeos para obter um adoçante com baixo valor calórico. Foi utilizada resina Dowex 50W-X4 na forma sódica, com diâmetro de partícula médio de 0,061 mm, a 60°C. Foram obtidas curvas de eluição em colunas (9 mm de diâmetro interno, 450 mm de comprimento e porosidade do leito de 0,381). O oligossacarídeo GF₄ (frutofuranosilnistose) foi eluído primeiramente, seguido de nistose (GF₃), 1-kestose (GF₂), sacarose, glicose e frutose. Os parâmetros coeficiente de transferência de massa, difusividade efetiva e número de Peclet foram determinados, sendo que seus valores aumentaram com o aumento do peso molecular dos açúcares. No cromatógrafo anular foram obtidos oligossacarídeos com pureza de 94%, mas dissacarídeos não foram separados.

Lin & Lee (1998) estudaram a separação de frutooligossacarídeos, obtidos pela ação de β -frutofuranosidase, por cromatografia de interação hidrofílica, tendo como adsorvente sílica não-porosa ativada com grupos amino. Os experimentos foram realizados em coluna cromatográfica de 10 cm, observando-se baixa capacidade devido à pequena área superficial da fase estacionária.

Boon *et al.* (2000) estudaram a remoção de oligossacarídeos por adsorção em carvão ativado durante a reação catalisada pela enzima β -galactosidase de *Bacillus circulans*. Os experimentos foram realizados misturando-se 1,6 g de carvão ativado com 8 mL de tampão

citrato-fosfato 0,02 M (pH 5,0) contendo açúcares em diferentes concentrações (6 a 108 g/L). A afinidade por trissacarídeos foi maior do que para mono e dissacarídeos. As curvas de ruptura foram obtidas para a mistura contendo lactose (5,9 g/L), galactose (5,8 g/L) e maltotriose (2,9 g/L), utilizando colunas de leito fixo pré-tratadas com tampão citrato-fosfato 0,02 M (pH 5,0) e lactose (5,9 g/L). Experimentos também foram realizados removendo continuamente os produtos durante a síntese, utilizando a enzima imobilizada, obtendo-se um rendimento superior de oligossacarídeos.

Kaplan & Hutkins (2000) estudaram a purificação de frutooligossacarídeos para a aplicação em meio MRS para identificação de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias capazes de fermentar frutooligossacarídeos. A mistura comercial de frutooligossacarídeos era composta de GF₂ (32%), GF₃ (53,6%), GF₄ (9,8%), glicose e frutose (2,3%) e sacarose (2,3%), foi preparada uma solução 40% de frutooligossacarídeos, sendo adicionada a uma coluna (30 x 5 cm), contendo carvão ativado. Glicose e frutose foram eluídas com água destilada, sacarose foi eluída com 5% de etanol e frutooligossacarídeos foram eluídos com 15 % de etanol.

Burkert (2003) estudou a separação de glicose, frutose e dextranas utilizando colunas com zeólitas. Foi verificado que através da troca iônica da zeólita, obteve-se uma separação mais eficiente dos açúcares. O tamanho do poro da zeólita utilizada para permitir a difusão de moléculas como glicose e frutose no interior do poro e a não penetração de moléculas maiores como a sacarose e dextrana foi determinado, correspondendo a 0,56 η m. No estudo da separação de glicose e frutose, verificou-se que a temperatura mostrou efeito pronunciado sobre a eficiência de separação. Já na separação de dextrana e frutose, ambos os parâmetros, temperatura e volume injetado, apresentaram influência na separação.

No que se refere à separação de açúcares, diversos trabalhos abordam a purificação de açúcares utilizando resinas de troca iônica e alguns trabalhos utilizando zeólitas na separação. Mas, poucos são os estudos onde se utiliza zeólitas na purificação de oligossacarídeos, sendo a purificação destes açúcares pouco estudada, principalmente através de colunas de leito fixo. Em vista disso, torna-se importante o estudo de novas formas de purificação destes oligossacarídeos, visto que numa forma mais purificada, estes açúcares apresentam alto valor comercial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a *Rhodotorula* sp., levedura isolada por HERNALSTEENS (doutorado em andamento), no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

3.2. PRODUÇÃO DA ENZIMA

3.2.1. Obtenção do Inóculo

O microrganismo utilizado no processo fermentativo foi mantido em ágar inclinado GYMP (cultura estoque), cuja composição é definida na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio GYMP.

Componentes	Composição (g. L⁻¹)
Glicose	20
Extrato de levedura	5
Extrato de malte	10
Fosfato monobásico de sódio	2

Para a obtenção do inóculo utilizou-se 100 mL do meio de cultura de composição definida na Tabela 2, em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL. O pH foi ajustado a 4,5 e a esterilização realizada a 121°C por 15 minutos. A incubação foi realizada em shaker a 150 rpm e 30°C durante 40 horas, sendo realizado dois repiques, um com 24 horas de incubação e outro com 16 horas.

Tabela 2: Composição do meio de cultura para obtenção do inóculo.

Componentes	Composição (g. L ⁻¹)
Glicose	20
Peptona	20
Extrato de Levedura	10
K ₂ HPO ₄	5

3.2.2. Fermentação

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer agitados em incubador rotativo (shaker) a 30°C e 250 rpm. O tempo total de fermentação foi de 36 horas.

Utilizou-se meio industrial otimizado por HERNALSTEENS (doutorado em andamento), composto por 90 g/L de água de maceração de milho (AMM) e 65 g/L de melação, a composição destes substratos é apresentada na Tabela 3. O pH foi ajustado a 4,5 e o inóculo foi adicionado em quantidade correspondente a 10% do volume de meio.

A água de maceração de milho é um produto obtido da maceração de grãos de milho, contendo em sua composição química, carboidratos solúveis, aminoácidos e sais minerais, nutrientes necessários ao desenvolvimento de várias espécies de microrganismos, sendo portanto um excelente meio de cultura.

Durante a fermentação realizou-se o acompanhamento da atividade enzimática. A fermentação foi paralisada quando se obteve o máximo de atividade da enzima.

Tabela 3: Composições aproximadas dos substratos industriais.

	Nitrogênio total (%)	Açúcares redutores totais (%)	Ácido Lático (%)	Sais (%)
Melação	0,5	45-60	-	-
AMM	50	7,5	18	6,1

Fonte: TREICHEL, 2001.

3.2.2.1. Clarificação do Meio

Os compostos água de maceração de milho (Corn Products Internacional, Mogi-Guaçu/SP) e melaço (Usina Éster, Cosmópolis/SP) sofreram um processo de clarificação, com o propósito de remover resíduos possivelmente inibidores e reduzir os custos na etapa de recuperação da enzima. Este procedimento foi realizado em condições definidas por Mendes (2006), consistindo em tratar os compostos separadamente com 4% (p/p) de carvão ativo ANFC em agitador rotativo a 150 rpm e 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, os compostos melaço e AMM foram filtrados (em papel) e centrifugados em centrífuga Sorvall refrigerada a 6000 x g, a 5°C por 10 minutos. Após esses procedimentos os mesmos foram adicionados ao meio nas concentrações definidas na fermentação.

3.2.3. Recuperação da Enzima

A recuperação da enzima a partir do caldo fermentado tem como finalidade a eliminação parcial de contaminantes para a obtenção de uma enzima mais purificada, sendo esta utilizada na síntese dos oligossacarídeos.

Para tanto, o meio fermentado foi centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall a 6000 x g por 15 minutos a 5 °C. Na centrifugação, as células foram separadas do caldo contendo as enzimas (sobrenadante), já que as mesmas são extracelulares. Após a centrifugação, a atividade enzimática do sobrenadante foi determinada.

Ao sobrenadante do caldo centrifugado adicionou-se lentamente, sob agitação álcool anidro (99,3^o INPM) a -20°C até atingir uma concentração de 70% em volume de álcool. O processo foi realizado em reator encamisado acoplado a um banho de refrigeração, mantendo a temperatura constante em 2°C. A agitação deve ser branda, de modo a evitar a desnaturação das enzimas.

Após a adição total do agente de precipitação, a solução foi centrifugada novamente (5°C) a 6000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo a enzima, foi ressuspenso em tampão acetato 0,05M pH 4,5. A atividade enzimática foi determinada, obtendo-se o rendimento de recuperação da enzima. A porcentagem de

recuperação foi calculada pela divisão da atividade total do precipitado pela atividade total do caldo enzimático.

3.3. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Considerando 1 unidade de frutofuranosidade (U_F) como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 μmol de sacarose por minuto e uma unidade de transfrutossilagem (U_{TF}) como a quantidade de enzima necessária para transferir 1 μmol de frutose por minuto, podem-se calcular as atividades pela determinação de ART e de glicose (CHEN & LIU, 1996; REMAUD-SIMEON *et al.*, 1994).

$$\begin{aligned}\text{Como:} \quad & \text{ART} = F + G \\ & F = \text{ART} - G \\ & F_T = G - F = 2G - \text{ART}\end{aligned}$$

Onde F é frutose, G é glicose, F_T é frutose transferida e ART, açúcares redutores totais. Então, as atividades podem ser calculadas, onde: $U_F = \text{ART}$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$], $U_{TF} = (2G - \text{ART})$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$].

De acordo com HIDAKA *et al.* (1988), quanto maior a razão U_{TF}/U_F da enzima maior a formação de frutooligossacarídeos, enquanto que um decréscimo na razão U_{TF}/U_F provoca um aumento de produtos hidrolisados, demonstrando assim que a atividade de transfrutossilagem é responsável pela produção de frutooligossacarídeos.

3.3.1. Determinação de Açúcares

A determinação de açúcares redutores foi realizada através do método espectrofotométrico de NELSON (1944) e SOMOGYI (1945). Para a determinação de açúcares redutores totais realizou-se a hidrólise com ácido clorídrico 2N.

Para a determinação de glicose liberada ao final da reação foi utilizado um kit enzimático de glicose-oxidase (Laborlab, Guarulhos/SP).

3.4. SÍNTESE DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Na etapa de síntese dos frutooligossacarídeos são obtidos principalmente GF₂ (kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (frutofuranosilnistose). Foi utilizado um micro-reator encamisado (6,5 x 3,5 cm), contendo enzima livre e uma solução de sacarose 50% em tampão acetato 0,05M pH 4,5. Sendo obtidos principalmente GF₂ (kestose) + GF₃ (nistose) + GF₄ (frutofuranosilnistose).

Para a realização da síntese foi calculada a quantidade de enzima para que o substrato utilizado, sacarose 50%, tivesse uma atividade final de 1 UI/mL. A síntese foi realizada durante aproximadamente 72 horas, retirando-se amostras ao longo do tempo para o acompanhamento da síntese dos frutooligossacarídeos.

3.5. ZEÓLITA

Para separação dos frutooligossacarídeos foi testada a zeólita Baylith WE 894 adquirida pela Pluryquímica (Guarulhos/SP), cuja composição é definida na Tabela 4.

Tabela 4: Composição da zeólita Y.

Componente	Teor (%)
Na ₂ O	10,57
Al ₂ O ₃	16,96
SiO ₂	58,93
Si/Al	3,07

3.6. PREPARO DA ZEÓLITA

A zeólita foi moída em moinho Tecnal a 8000 rpm por 5 segundos e peneirada para que se obtivessem partículas em diferentes faixas de diâmetros. O diâmetro de partícula ideal para a separação dos açúcares foi testado através de ensaios com diferentes granulometrias, conforme item 3.9.

Para a separação dos oligossacarídeos, foi testada outra forma catiônica da zeólita, visto que a mesma é fornecida na forma sódica. Portanto realizou-se a troca iônica da zeólita, descrita no item 3.6.1. (BURKERT, 2003).

3.6.1. Troca iônica

A troca iônica da zeólita foi realizada utilizando-se metodologia citada por SILVA (1998). Segundo estudos realizados por BURKERT (2003), os oligossacarídeos são adsorvidos quando a zeólita está na forma bária. Desta forma, o íon selecionado para a troca iônica na matriz da zeólita foi o íon bário.

Primeiramente determinou-se a umidade da zeólita em mufla a 700°C. A seguir foi calculada a quantidade de íons a ser trocada, pelo número de equivalentes grama de Na₂O presente na zeólita (10,57% na zeólita original). Foram calculadas também as quantidades de zeólita, água e solução salina para resultar em uma concentração final de 15% de sólidos, que corresponde a zeólita seca efetivamente presente no reator de troca iônica.

A quantidade de zeólita calculada foi suspensa em água e o pH foi acertado entre 5 e 6 com ácido clorídrico 10%. A seguir, misturou-se cloreto de bário dihidratado (BaCl₂.2H₂O) 35%, conforme quantidade estequiométrica necessária à troca.

A suspensão final foi colocada em tubos de centrífuga acoplados, com uma agitação constante e branda durante 24 horas. A temperatura para a troca é de 75°C, ajustada através de banho termostatizado.

Ao final das 24 horas, a suspensão foi filtrada em funil de Buchner realizando-se duas lavagens. Na primeira, a torta foi lavada com solução BaCl₂.2H₂O 35% na mesma quantidade utilizada na troca. A segunda lavagem foi realizada com água deionizada, com o dobro do volume utilizado na troca. A temperatura das soluções de lavagem deve ser a mesma da troca (75°C).

3.7. METODOLOGIA DE RESPOSTA A PULSOS CROMATOGRÁFICOS

Os ensaios foram realizados de acordo com a resposta de pulsos cromatográficos, que consiste na alimentação da coluna com um pulso de adsorbato, de volume fixo, e posterior eluição da mesma com um desorvente, com vazão controlada por bomba peristáltica Masterflex. A separação é atingida na forma de bandas. Estes parâmetros foram avaliados utilizando-se a eficiência de separação (ES) como resposta, que é a distância média dos picos dos componentes envolvidos na separação e a distribuição de cada pico, podendo ser calculada pelas equações 2, 3 e 4.

$$(ES)_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\sigma_{12}} \quad (2)$$

onde:

$$\sigma_{12} = (\sigma_1 \sigma_2)^{1/2} \quad (3)$$

$$\Delta t_{12} = |\mu_1 - \mu_2| \quad (4)$$

O primeiro (μ) e o segundo (σ^2) momentos para cada componente da mistura a ser separada são definidos pelas equações 5 e 6, respectivamente:

$$\mu_i = \frac{\sum_{i=1}^n C_i t_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (5)$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n C_i (t_i - \mu_i)^2 \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (6)$$

Onde: C_i é a concentração do componente na fração i

t_i é o tempo

Δt_i é o intervalo de amostragem

n é o número da fração.

3.8. SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES

A coluna cromatográfica foi preenchida com a zeólita Y trocada com íons bário e o empacotamento foi realizado com água deionizada.

A coluna cromatográfica utilizada tem as dimensões de 50 cm de altura por 1 cm de diâmetro. Esta coluna é encamisada para o controle de temperatura, a qual foi variada de 40 a 50°C. Para a manutenção da temperatura dos experimentos, foi acoplado a coluna um banho termostático (Tecnal TE-184), permitindo a circulação de água na camisa da coluna. O eluente utilizado foi o etanol, a diferentes concentrações.

O esquema da montagem para a separação dos açúcares está demonstrado na Figura 5. O “loop” possui o volume exato do pulso que se pretende introduzir na coluna. A amostra foi colocada no “loop” com o auxílio de uma seringa, desligando-se a bomba, fechando-se o sentido normal do fluxo e abrindo-se as entradas laterais do “loop”. Uma vez completado o volume do “loop” com a amostra, retorna-se ao fluxo normal, ligando a bomba em seguida. Desta forma o pulso foi introduzido na coluna de separação. As amostras foram coletadas a cada 20 minutos através de um coletor de frações Fracsil 100.

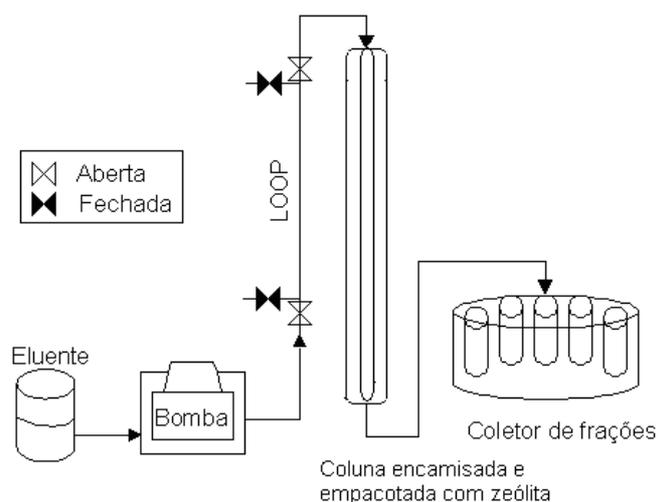


Figura 5: Montagem da separação dos açúcares em leito de zeólita. Y.

A determinação da concentração de açúcares na saída da coluna foi realizada através de cromatografia líquida de íons (HPLC-PAD), descrita no item 3.10.

3.9. INFLUÊNCIA DA GRANULOMETRIA DE PARTÍCULA NA SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES

Esta etapa do trabalho foi realizada baseando-se no estudo realizado por Lorenço (2004), utilizando colunas de leito fixo de 35 e 50 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro, variando-se a granulometria das partículas, foram utilizados diâmetros de partículas entre 105-125 μm , 125-149 μm , 177-210 μm e 250-297 μm . A metodologia de resposta a pulsos cromatográficos foi empregada a uma vazão de 0,08 e 0,12 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o volume de amostra injetado na coluna foi de 1, 1,35 e 2 mL, foi utilizado etanol como eluente nas concentrações de 20 e 40% (v/v) e temperatura de 30 e 40°C.

3.10. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR CROMATOGRRAFIA DE ÍONS

3.10.1. Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada através de um sistema HPLC-PAD (DIONEX) com detector eletroquímico ED40, sistema de bombas GP50, detector de pulso amperométrico, eletrodo de ouro, software PEAKNET para aquisição e processamento de dados, pré-coluna (4 x 50mm) e coluna carbopac PA100 (4 x 250 mm). A pré-coluna e a coluna foram conectadas em série seguindo as condições padrão.

3.10.2. Preparo da Fase Móvel

O critério para análise dos açúcares em HPLC-PAD foi a solubilidade da fase móvel. A fase móvel utilizada foi NaOH 50 mM e acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM. A fase móvel foi desgaseificada durante 5 minutos com nitrogênio. Sendo utilizado um método para eluição dos carboidratos com um gradiente utilizando uma combinação dos dois solventes.

3.10.3. Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram diluídas convenientemente, de modo a obterem-se concentrações entre 10-50 mg/L, para a identificação e quantificação através do sistema de cromatografia de íons (HPLC-PAD).

Para a identificação e quantificação dos carboidratos foi construída uma curva de calibração, através da preparação de soluções padrões de kestose, nistose e frutofuranosilnistose, adquiridos junto à companhia japonesa Wako Dako Industries Ltda, e glicose, frutose e sacarose da Merck. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada com base no melhor coeficiente de regressão obtido. O software PEAKNET foi utilizado para a construção da curva de calibração a partir dos padrões injetados, além de quantificar as amostras (SANTOS, 2002).

3.10.4. Injeção das Amostras no Sistema HPLC-PAD

As amostras foram injetadas em uma coluna carbopac PA100, utilizando um amostrador automático (SpectoSERIES AS 100), nas seguintes condições de operação:

Temperatura ambiente: 22 – 24°C

Volume de injeção: 25 µl

Fluxo do eluente: 1,0 mL/min

Tempo de corrida: 40 minutos

3.11. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia do planejamento experimental é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et al.*, 1978).

Dentre as vantagens da utilização do planejamento experimental podemos destacar a redução do número de experimentos, melhora na qualidade da informação obtida diminuindo o trabalho, tempo e custo final, análise de fatores simultaneamente, otimização de mais de uma

resposta ao mesmo tempo e cálculo do erro experimental, estimando a reprodutibilidade do resultado desejado (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Quando se desconhece o processo utilizado ou quando muitas variáveis estão envolvidas, desconhecendo-se a importância de cada uma delas, opta-se pelo planejamento fatorial fracionário. O fato de não se escolher de imediato o planejamento fatorial completo se deve principalmente ao número de variáveis. Assim, o planejamento fatorial fracionário pode trabalhar com um número reduzido de experimentos, devendo-se levar em consideração o número de efeitos de interação de ordem alta, aumentando consideravelmente com o número de fatores. Não se pode excluir de uma forma totalmente arbitrária fatores potencialmente importantes, sendo que é conveniente incluir no estudo, o maior número de variáveis possíveis. Por este motivo escolhe-se o planejamento fracionário ao invés do planejamento fatorial completo (SANTOS, 2002).

Neste trabalho utilizou-se o planejamento fracionário para verificar quais as variáveis que apresentavam efeitos significativos na eficiência de separação (ES) dos açúcares. A eficiência de separação (ES), foi calculada, segundo as equações descritas no item 3.7 e comparadas entre si.

Os parâmetros analisados no planejamento foram, a temperatura ($T^{\circ}\text{C}$), volume injetado (V mL), velocidade de escoamento (v mL.min⁻¹) na coluna e composição do eluente (E%). Estes parâmetros foram estudados segundo um planejamento experimental fracionado 2^{4-1} . Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 5. A matriz dos ensaios pode ser visualizada na Tabela 6. Os ensaios deste planejamento (incluindo os três pontos centrais) foram realizados em ordem aleatória utilizando o método de resposta a pulsos cromatográficos.

Tabela 5: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário 2^{4-1} para eficiência de separação de açúcares.

Níveis	T(°C)	v (mL/min)	V(mL)	E (%)
-1	40	0,08	1	40
0	45	0,1	2	50
+1	50	0,12	3	60

E (%): Concentração de etanol

v: Velocidade de escoamento (mL.min⁻¹)

V: Volume injetado na coluna (mL)

T: Temperatura (°C)

Tabela 6: Matriz do delineamento experimental 2^{4-1} para verificar a eficiência na separação de açúcares.

Ensaio	T (°C)	v (mL/min)	V(mL)	E (%)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA

4.1.1. Fermentação

A fermentação foi mantida durante 36 horas, a uma temperatura de 30°C e 250 rpm. Amostras foram retiradas durante a fermentação para monitoramento da atividade enzimática.

Através do monitoramento da atividade, verificou-se que a maior atividade era obtida com 24 horas de fermentação. Resultando em uma atividade da enzima de 10,7 U_{TF} (atividade de transfrutossilação) e 3,99 U_F (atividade de frutofuranosidade), como pode ser visualizado na Tabela 7.

Para que se obtenha uma eficiente produção de oligossacarídeos é necessário que a atividade de transferência de 1 μmol de frutose (U_{TF}) seja maior que a capacidade de hidrolisar 1 μmol de sacarose (U_F), ou seja, quanto maior a razão de U_{TF}/U_F , maior a produção de frutooligossacarídeos. Foi então utilizado o meio fermentado com 24 horas na obtenção da enzima, visto que este apresentou maior razão (U_{TF}/U_F), sendo esta de 2,68 e com 36 horas de fermentação foi conseguida uma razão de 0,84.

Tabela 7: Atividade enzimática durante a fermentação da *Rhodotorula* sp.

Atividade enzimática	24 h	36 h
U_{TF}	10,7	6,00
U_H	3,99	7,17
Razão U_{TF}/U_H	2,68	0,84

4.1.2. Recuperação da Enzima

A etapa de recuperação da enzima foi realizada utilizando-se etanol. O caldo fermentado contendo a enzima foi centrifugado a 6000 x g a 5°C durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado na recuperação.

Após a adição de etanol ao sobrenadante e centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão acetato 0,05M a pH 4,5. No processo de recuperação obteve-se uma atividade final de 72,2 UI/mL.

Conhecendo-se a atividade enzimática antes e após a recuperação, e os respectivos volumes antes e após a precipitação, pode-se calcular a recuperação enzimática através da Equação 7. A recuperação enzimática calculada foi de 67,5%, sendo esta recuperação considerada satisfatória, comparando com o estudo realizado por VARANDA (2005), onde foi obtida uma recuperação de 20%.

$$E.R = \frac{(Atividade_{enzimática} \cdot Volume)_{depois}}{(Atividade_{enzimática} \cdot Volume)_{antes}} \quad (7)$$

4.2. SÍNTESE DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Na Tabela 8, podem ser visualizados os frutooligossacarídeos sintetizados, o rendimento da síntese foi de 52,3%, sendo sintetizados 261,74 g/L de frutooligossacarídeos. Observa-se que na etapa de síntese a sacarose não foi totalmente hidrolisada, não sendo utilizada totalmente na formação dos frutooligossacarídeos, isto pode ser explicado pela pequena quantidade de enzima utilizada. Estudos realizados por HERNALSTEENS (doutorado em andamento) indicam que utilizando uma maior quantidade de enzima cerca de 5 UI/mL, menor o tempo de síntese e também maior a produção de nistose (GF₃) e frutofuranosilnistose (GF₄).

Tabela 8: Concentração de açúcares após a síntese enzimática.

Açúcares	Concentração (g/L)
Glicose	135,85
Frutose	24,91
Sacarose	77,50
Kestose (GF ₂)	179,44
Nistose (GF ₃)	76,50
Frutofuranosilnistose (GF ₄)	5,80
Total de frutooligossacarídeos	261,74

4.3. ENSAIOS PRELIMINARES NA SEPARAÇÃO DOS AÇÚCARES

A separação cromatográfica dos frutooligossacarídeos foi realizada em coluna de leito fixo empacotada com zeólita Y Baylith WE 894 trocada com íons Ba^{++} . Foram realizados ensaios preliminares para definir o diâmetro de partícula utilizado nos ensaios a fim de se encontrar a melhor separação dos picos cromatográficos.

A resposta a pulsos cromatográficos foi analisada pelo método proposto por Lu & Lee (1987), citado por Cavenaghi (1999), com base no cálculo da eficiência de separação entre os picos (ES), calculada pelas equações 2, 3 e 4.

4.3.1. Testes iniciais para definição do diâmetro de partícula

Inicialmente pretendeu-se definir o diâmetro de partícula utilizado nos ensaios. Portanto foi empacotada uma coluna de vidro de (35 x 1) cm com zeólitas de diâmetro de partícula entre 105-125 μm . Conforme estudos realizados por Burkert (2003) e Lorenço (2004), esta faixa de diâmetro foi utilizada na realização dos ensaios para separação de glicose e frutose. Entretanto, este diâmetro de partícula não possibilitou a realização dos ensaios, pois após a injeção da solução de açúcares na coluna, a mesma não apresentou a performance desejada, devido a uma excessiva perda de carga. A solução de açúcares contendo os frutooligossacarídeos é mais viscosa que as soluções de mono e dissacarídeos, em concentrações similares, fato este que provavelmente originou o aumento da perda de carga durante a eluição da solução na coluna.

Realizou-se um experimento onde foi empacotada uma coluna com zeólitas de diâmetro de partícula entre 125-149 μm . Neste ensaio utilizou-se também uma coluna de vidro de (35 x 1) cm, onde a vazão foi fixada em 0,08 $mL \cdot min^{-1}$, a quantidade de amostra injetada foi de aproximadamente 5% do volume da coluna (1,35 mL), a temperatura foi fixada em 30°C e o eluente utilizado foi o etanol 20% (v/v). Os resultados podem ser visualizados na Figura 6.

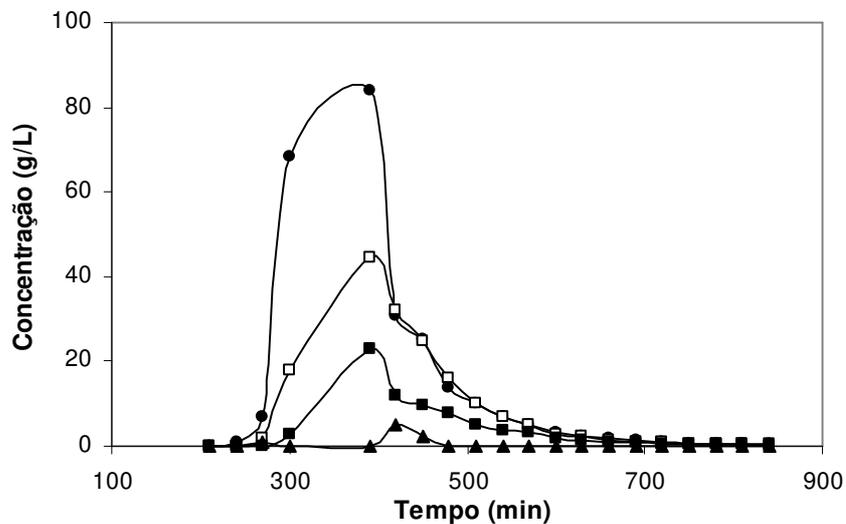


Figura 6: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲), com zeólita de diâmetro de partícula entre 125-149 μm , $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 20\%$.

A eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,32, entre oligossacarídeos e frutose de 0,47, entre oligossacarídeos e sacarose de 0,31 e entre glicose e frutose de 0,17. Com este diâmetro de partícula utilizado no ensaio não foram conseguidas vazões maiores, ou seja, só foi possível a alimentação da coluna numa vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, portanto este diâmetro de partícula não pôde ser utilizado.

Foi então empacotada uma coluna Pharmacia de (50 x 1) cm com zeólitas de diâmetro de partícula entre 250-297 μm . O ensaio foi realizado com eluente etanol 40% (v/v), a vazão de alimentação foi de $0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o volume injetado na coluna foi de 2 mL e a temperatura foi fixada em 30°C . A Figura 7 apresenta os resultados encontrados neste ensaio.

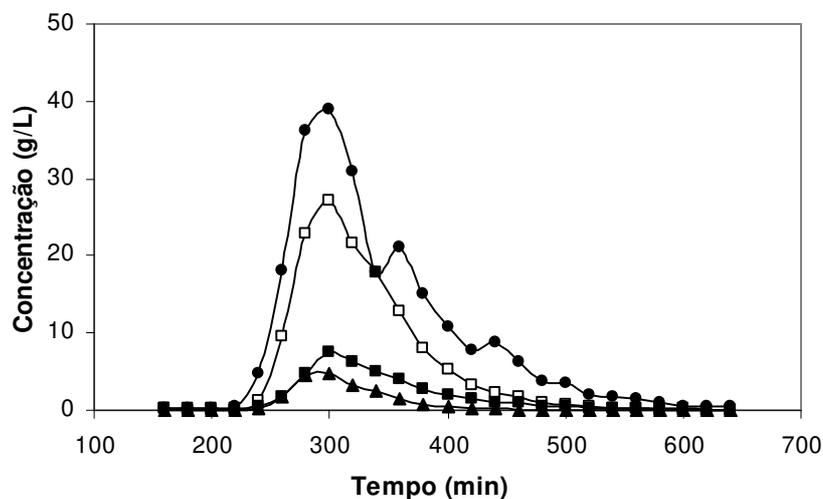


Figura 7: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com zeólita de diâmetro de partícula entre 250-297 μm , $v = 0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$.

A eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,21, entre oligossacarídeos e frutose de 0,006, entre oligossacarídeos e sacarose de 0,42 e entre glicose e frutose de 0,21. Mesmo aumentando a concentração de etanol de 20 para 40% (v/v) não foi observado um aumento na eficiência de separação dos açúcares, como era esperado. A melhora na eficiência de separação foi comprometida pelo aumento do tamanho de partícula da zeólita utilizada neste ensaio.

Com a mesma coluna foi realizado um ensaio, onde se pretendeu verificar a influência da concentração inicial de açúcares na eficiência de separação. As condições do ensaio foram, etanol 40% (v/v), volume de injeção de açúcares na coluna de 2 mL e vazão de alimentação de $0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de 30°C , a amostra tinha uma concentração inicial de 250 g/L de açúcares. A eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,12 entre oligossacarídeos e frutose de 0,04, oligossacarídeos e sacarose de 0,72 e entre glicose e frutose de 0,08, resultados estes demonstrados na Figura 8.

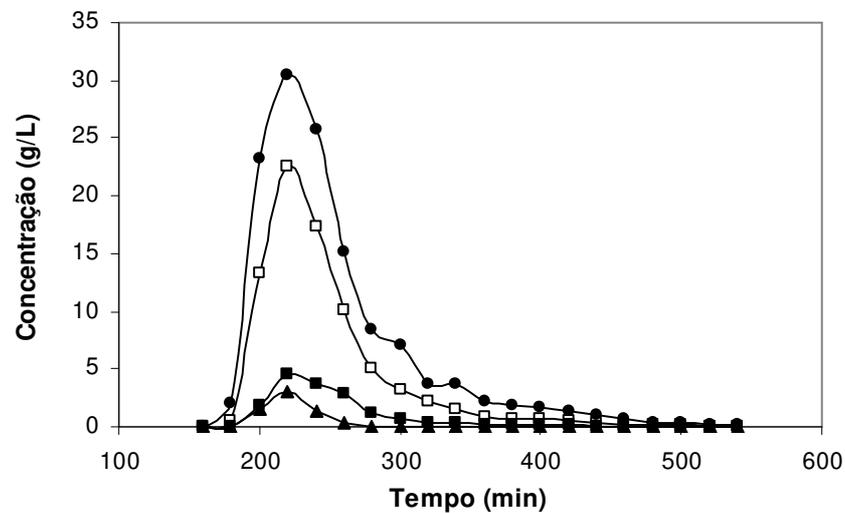


Figura 8: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com zeólita de diâmetro de partícula de 250-297 μm , concentração inicial de açúcares de 250 g/L, $v = 0,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 30^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$.

Analisando-se estes resultados, verifica-se que com o aumento da granulometria da zeólita e com a diluição da amostra a eficiência de separação dos picos ficou comprometida. Portanto, através dos ensaios realizados pôde-se concluir que o diâmetro de partícula influencia na separação dos açúcares. Para a continuação dos estudos optou-se pela utilização de um diâmetro de partícula inferior ao utilizado no último ensaio, sendo que desta maneira a amostra deverá ser diluída, para obtenção da vazão desejada. Visando desta maneira uma melhora na separação, pois segundo estudos realizados por Cheng e Lee (1992) diâmetros menores que 20-40 mesh apresentam melhores resultados na eficiência de separação dos açúcares.

Após esta etapa do trabalho, optou-se pela mudança dos níveis reais das variáveis do planejamento experimental, onde inicialmente a temperatura variava de 30 a 40°C , a concentração de etanol de 20 a 40% (v/v) e o volume injetado de 5 a 15 % do volume total da coluna. Foi observado que a eficiência de separação poderia ser melhorada através do aumento da temperatura e da concentração de etanol, assim como pela diminuição do volume de amostra injetado na coluna, sendo assim, estes níveis foram redefinidos.

Foi então realizado um ensaio com diâmetro de partícula de 177-210 μm , utilizando eluente etanol 40% (v/v), vazão de alimentação de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de açúcares injetado de 1mL e temperatura de 40°C , a amostra inicial tinha concentração de 200 g/L. Foi observado que a eficiência de separação foi melhorada, resultados estes demonstrados pela Figura 9, onde a eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,34, entre oligossacarídeos e frutose de 0,72, entre oligossacarídeos e sacarose de 0,1 e entre glicose e frutose de 0,40.

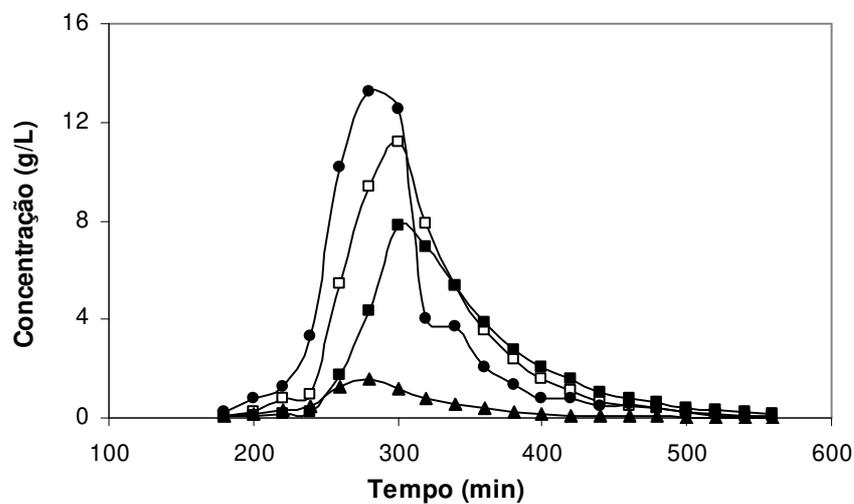


Figura 9: Separação de oligossacarídeos (•), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com zeólita de diâmetro de partícula de 177-210 μm , com concentração inicial de açúcares de 200 g/L, $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $T = 40^{\circ}\text{C}$, $E = 40\%$.

Através dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, definiu-se que o diâmetro de partícula da zeólita utilizado no planejamento fracionário 2^{4-1} seria de 177-210 μm , e a amostra diluída até concentração inicial de 250 g/L.

4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO

Estudos conduzidos em coluna de leito fixo realizados por Lorenço (2004) demonstraram que a separação é melhorada através do aumento do tamanho do leito. Portanto na realização do planejamento fracionário foi utilizada uma coluna Pharmacia (50 x 1 cm).

A Tabela 9 apresenta as eficiências de separação obtidas nos ensaios delineados de acordo com o planejamento experimental fracionário 2^{4-1} . Observa-se que os valores das eficiências ($ES_{\text{olig/glic}}$, $ES_{\text{olig/frut}}$, $ES_{\text{olig/sac}}$, $ES_{\text{glic/frut}}$, $ES_{\text{glic/sac}}$ e $ES_{\text{frut/sac}}$), variaram de acordo com a temperatura, vazão de alimentação na coluna, volume de açúcares injetado e concentração de etanol.

Tabela 9: Valores reais das variáveis estudadas e eficiência de separação dos açúcares em coluna de leito fixo.

Ensaio	T(°C)	v(mL/min)	V(mL)	E (%)	$ES_{\text{olig/glic}}$	$ES_{\text{olig/frut}}$	$ES_{\text{olig/sac}}$	$ES_{\text{glic/frut}}$	$ES_{\text{glic/sac}}$	$ES_{\text{frut/sac}}$
1	40	0,08	1	40	0,30	0,70	0,10	0,42	0,41	0,82
2	50	0,08	1	60	0,37	0,84	0,12	0,50	0,50	0,96
3	40	0,12	1	60	0,13	0,48	0,09	0,37	0,23	0,58
4	50	0,12	1	40	0,012	0,19	0,06	0,18	0,07	0,25
5	40	0,08	3	60	0,39	0,95	0,10	0,57	0,50	1,09
6	50	0,08	3	40	0,09	0,09	0,11	0,19	0,02	0,21
7	40	0,12	3	40	0,04	0,29	0,07	0,27	0,11	0,37
8	50	0,12	3	60	0,05	0,21	0,15	0,26	0,20	0,08
9	45	0,10	2	50	0,36	0,87	0,11	0,52	0,48	1,00
10	45	0,10	2	50	0,32	0,73	0,07	0,43	0,39	0,81
11	45	0,10	2	50	0,46	0,89	0,04	0,44	0,51	0,96

$ES_{\text{olig/glic}}$: Eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose,

$ES_{\text{olig/frut}}$: Eficiência de separação entre oligossacarídeos e frutose,

$ES_{\text{olig/sac}}$: Eficiência de separação entre oligossacarídeos e sacarose,

$ES_{\text{glic/frut}}$: Eficiência de separação entre glicose e frutose,

$ES_{\text{glic/sac}}$: Eficiência de separação entre glicose e sacarose,

$ES_{\text{frut/sac}}$: Eficiência de separação entre frutose e sacarose.

Na análise do planejamento experimental fracionário, foi considerada principalmente a resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose para a continuação do estudo, devido a serem estes os açúcares de maior concentração na mistura e de maior interesse na separação. Foram então analisados os efeitos entre oligossacarídeos e glicose, demonstrados na Tabela 10, onde somente a vazão teve efeito significativo a nível de

significância de 10% ($p < 0,1$). As demais variáveis não foram estatisticamente significativas a 10% ($p > 0,1$).

Tabela 10: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose.

	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	0,229	0,042	5,476	0,0015*
(1) Temperatura	-0,085	0,098	-0,861	0,4225
(2) Vazão	-0,230	0,098	-2,337	0,0580*
(3) Volume injetado	-0,061	0,098	-0,616	0,5604
(4) Etanol (%)	0,125	0,098	1,268	0,2518

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Calculando os efeitos para a eficiência de separação entre oligossacarídeos e frutose, visualizados na Tabela 11, as variáveis, temperatura, vazão e concentração de etanol foram significativas a nível de significância de 10%, sendo que a vazão e a temperatura tiveram efeitos negativos sobre a resposta, ou seja, quanto menor a vazão de alimentação da coluna e temperatura de trabalho, melhor a eficiência de separação. A concentração de etanol apresentou um efeito positivo, quanto maior a sua concentração melhor a eficiência de separação destes açúcares.

Tabela 11: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligossacarídeos e frutose.

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p-valor
Média	0,567	0,026	21,581	0,0021*
(1) Temperatura	-0,273	0,062	-4,421	0,0476*
(2) Vazão	-0,353	0,062	-5,718	0,0292*
(3) Volume injetado	-0,168	0,062	-2,717	0,1130
(4) Etanol (%)	0,303	0,062	4,907	0,0391*

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Analisando a resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e sacarose, nenhuma das variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos sobre a resposta, como pode ser visualizado na Tabela 12.

Tabela 12: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre oligossacarídeos e sacarose.

	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	0,093	0,010	9,631	0,0001*
(1) Temperatura	0,020	0,023	0,886	0,4098
(2) Vazão	-0,015	0,023	-0,664	0,5312
(3) Volume injetado	0,015	0,023	0,664	0,5312
(4) Etanol (%)	0,030	0,023	1,329	0,2323

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Analisando a resposta eficiência de separação entre glicose e frutose, foi observado que as variáveis, temperatura, vazão e concentração de etanol apresentaram efeitos significativos a nível de significância de 10%, visualizado na Tabela 13, sendo que a concentração de etanol teve um efeito positivo sobre a resposta e a temperatura e a vazão apresentaram efeitos negativos.

Tabela 13: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre glicose e frutose.

	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	0,377	0,027	13,858	0,00001*
(1) Temperatura	-0,125	0,064	-1,958	0,09800*
(2) Vazão	-0,150	0,064	-2,349	0,05711*
(3) Volume injetado	-0,045	0,064	-0,705	0,50735
(4) Etanol (%)	0,160	0,064	2,506	0,04615*

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Observando a Tabela 14, verifica-se que a vazão e a concentração de etanol foram as variáveis com efeitos significativos a nível de significância de 10% quando foi analisada a eficiência de separação entre glicose e sacarose, onde a concentração de etanol apresentou efeito positivo e a vazão um efeito negativo.

Tabela 14: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre glicose e sacarose.

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p-valor
Média	0,311	0,019	16,512	0,0036*
(1) Temperatura	-0,115	0,044	-2,604	0,1212
(2) Vazão	-0,205	0,044	-4,642	0,0434*
(3) Volume injetado	-0,095	0,044	-2,151	0,1644
(4) Etanol (%)	0,205	0,044	4,642	0,0434*

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Analisando a eficiência de separação entre frutose e sacarose (Tabela 15), verifica-se que somente a vazão apresentou efeito significativo sobre a resposta, sendo este efeito negativo, ou seja, quanto menor a vazão melhor a eficiência de separação destes açúcares.

Tabela 15: Efeito das variáveis na eficiência de separação entre frutose e sacarose.

	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	0,648	0,083	7,803	0,0002*
(1) Temperatura	-0,340	0,195	-1,745	0,1316
(2) Vazão	-0,450	0,195	-2,310	0,0603*
(3) Volume injetado	-0,215	0,195	-1,104	0,3121
(4) Etanol (%)	0,265	0,195	1,360	0,2226

*Variáveis significativas quando $p = 0,1$.

Para a continuação do estudo, foi observado que a variável vazão foi significativa para todas as respostas estudadas, com exceção da resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e sacarose, nos próximos ensaios foi então variada a vazão de 0,06 a 0,1 mL.min⁻¹ e as demais variáveis (concentração de etanol, volume de açúcar injetado na coluna e temperatura) que não apresentaram efeito significativo a nível de significância de 10 % foram fixadas.

Para a definição de qual nível do planejamento seria fixado para as demais variáveis não significativas foi considerado os resultados encontrados no planejamento fracionário, onde observou-se que com uma menor quantidade de açúcares injetado na coluna melhor a eficiência de separação entre os açúcares, fixou-se então o volume de açúcares injetado na

coluna em 1 mL. A concentração de etanol foi fixada em 50% (v/v), considerando o estudo realizado por Lorenço (2004), onde foi observado que quanto maior a concentração de etanol no eluente melhor a eficiência de separação.

Como a temperatura não foi estatisticamente significativa dentro da faixa estudada, optou-se por fixá-la em 50°C, porque através de estudos realizados por Burkert (2003), temperaturas mais elevadas apresentaram efeito positivo na separação dos açúcares, resultados semelhantes foram encontrados por Cheng & Lee (1992), onde apenas em temperaturas acima de 60°C a separação ficou comprometida, através do escurecimento da amostra.

Os resultados obtidos nestes ensaios estão apresentados na Tabela 16. As Figuras 10, 11 e 12, representam os ensaios com vazão de 0,06, 0,08 e 0,1 mL.min⁻¹, respectivamente.

Tabela 16: Eficiência de separação (ES) dos açúcares com etanol 50% em coluna.

Vazão (mL.min ⁻¹)	ES _{olig/glic}	ES _{olig/frut}	ES _{olig/sac}	ES _{glic/frut}	ES _{glic/sac}	ES _{frut/sac}
0,06	0,19	0,43	0,10	0,26	0,29	0,53
0,08	0,13	0,46	0,11	0,27	0,23	0,59
0,1	0,04	0,33	0,13	0,31	0,17	0,47

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 16, pôde-se verificar que a eficiência de separação não foi melhorada, foi então realizado um ensaio fixando a vazão em 0,08 mL.min⁻¹, a temperatura em 50°C, o volume injetado em 1 mL sendo utilizado etanol 60% (v/v), para definirmos qual a influência da concentração de etanol na separação.

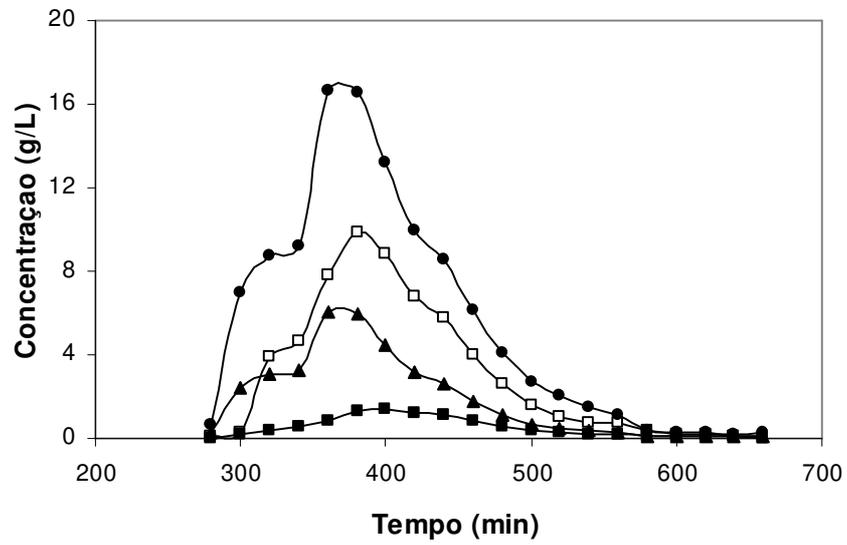


Figura 10: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de 0,06 mL.min⁻¹.

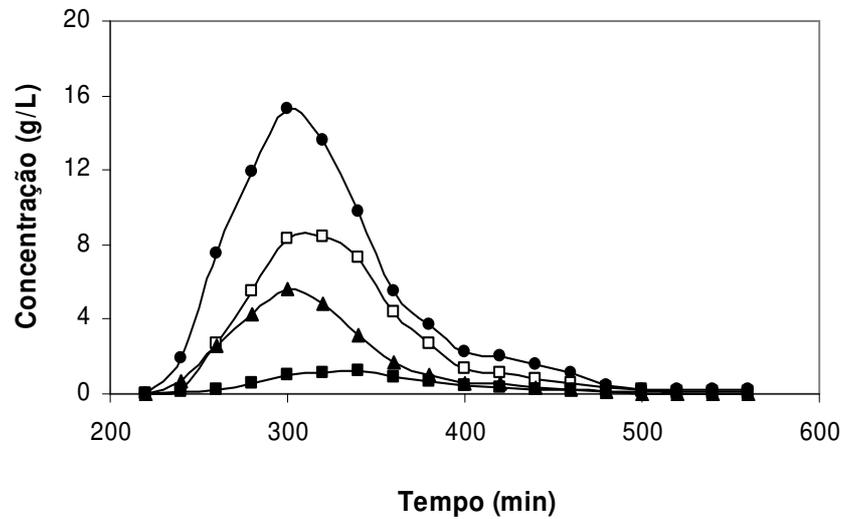


Figura 11: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de 0,08 mL.min⁻¹.

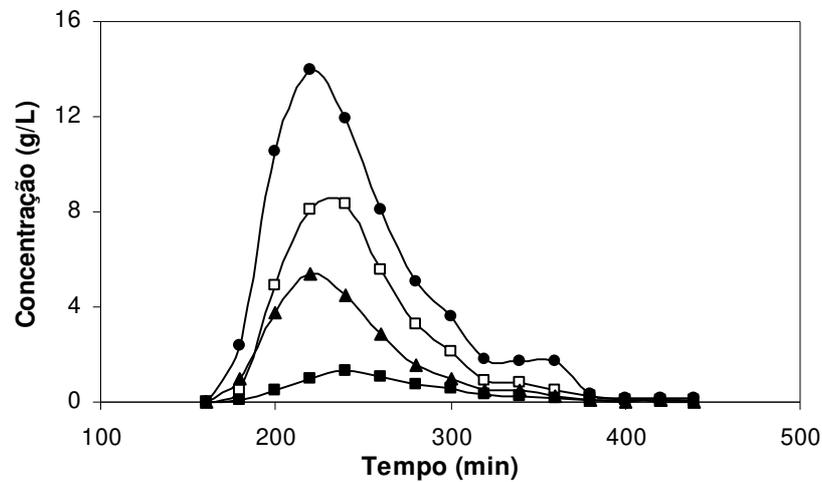


Figura 12: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Analisando os resultados do ensaio utilizando etanol 60% (v/v), verifica-se que a eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,31, entre oligossacarídeos e frutose de 0,76, entre oligossacarídeos e sacarose de 0,18 e entre glicose e frutose de 0,38. Através destes resultados apresentados na Figura 13, percebe-se que a separação foi melhorada com o aumento da concentração de etanol. Foi então redefinido para os próximos ensaios que a concentração de etanol utilizada seria de 60% (v/v).

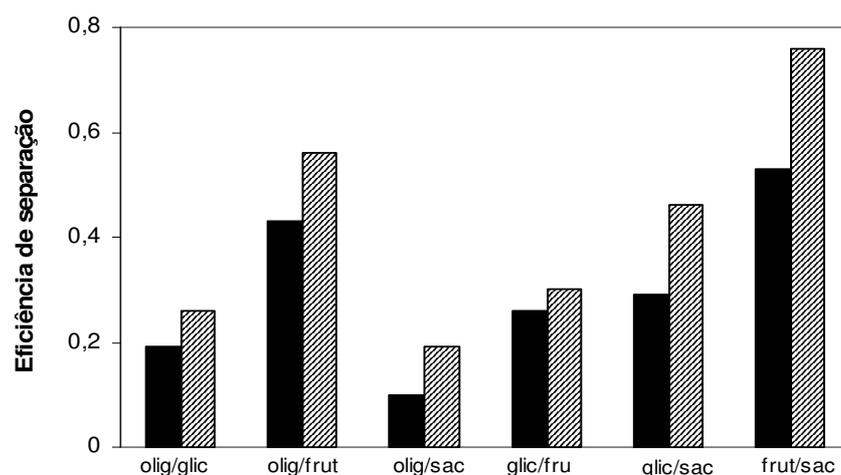


Figura 13: Eficiência de separação utilizando E= 50% (■) e E= 60% (▨).

No próximo experimento definiu-se qual a temperatura mais adequada para a obtenção de uma melhor eficiência de separação entre os açúcares. Foi então realizado um ensaio utilizando temperatura de 45^oC, as demais variáveis foram mantidas, volume de injeção de 1 mL, vazão de 0,08 mL.min⁻¹ e etanol 60% (v/v). A eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,26, oligossacarídeos e frutose de 0,65, oligossacarídeos e sacarose de 0,19 e glicose e frutose de 0,41, estes resultados podem ser visualizados através da Figura 14. A partir deste ensaio foi então definida que a temperatura de trabalho seria a de 50^oC, por ter apresentado uma melhor eficiência de separação de oligossacarídeos com glicose e frutose.

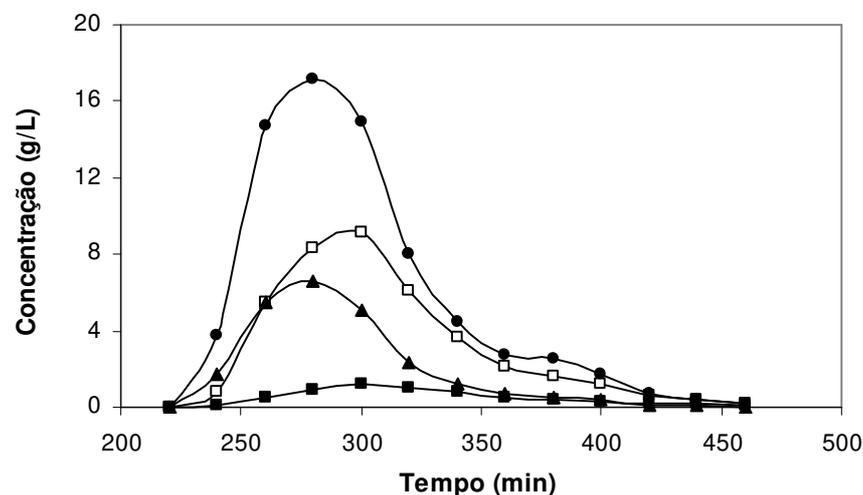
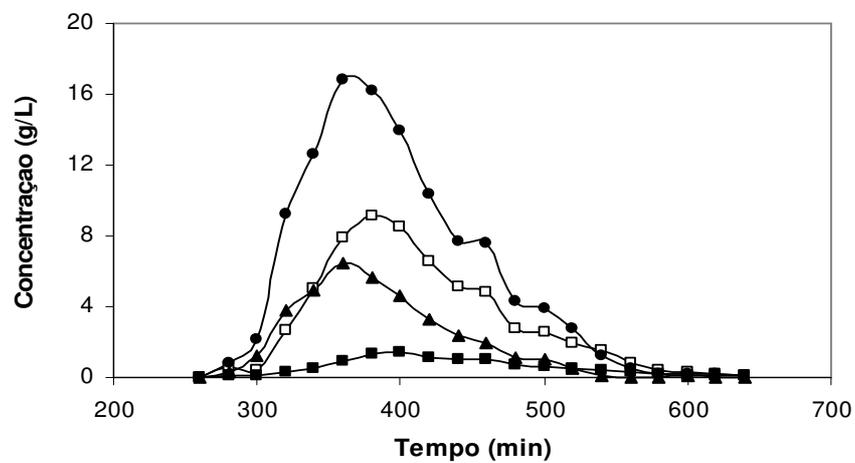
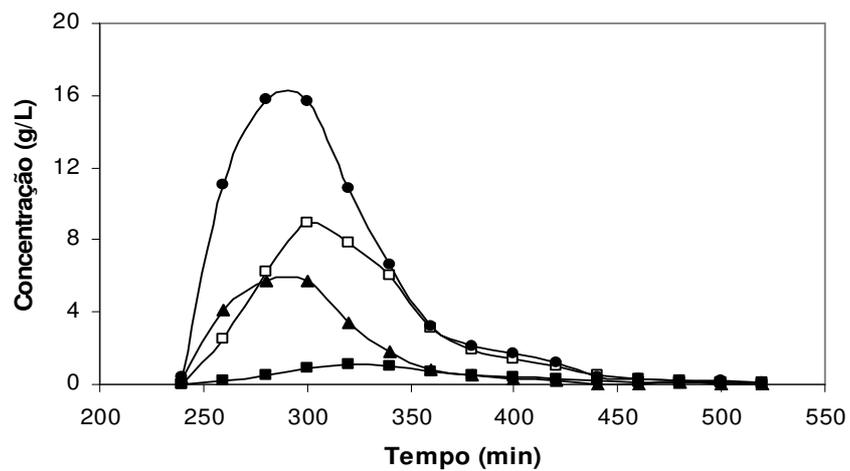


Figura 14: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) a 45^oC.

Foram então refeitos os ensaios onde foi utilizado anteriormente etanol 50% (v/v) sendo variada a vazão de 0,06 a 0,1 mL.min⁻¹ e fixando-se as demais variáveis, temperatura em 50^oC, volume de injeção (1 mL), concentração de etanol 60% (v/v). Os resultados para eficiência de separação entre os açúcares estão apresentados na Tabela 17. Nas Figuras 15, 16 e 17 estão representados os resultados para a vazão de 0,06, 0,08 e 0,1 mL.min⁻¹, respectivamente.

Tabela 17: Eficiência de separação dos açúcares com $E = 60\%$, $T = 50^{\circ}\text{C}$ e $V = 1\text{mL}$.

Vazão ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	$ES_{\text{olig/glic}}$	$ES_{\text{olig/frut}}$	$ES_{\text{olig/sac}}$	$ES_{\text{glic/frut}}$	$ES_{\text{glic/sac}}$	$ES_{\text{frut/sac}}$
0,06	0,26	0,56	0,19	0,30	0,46	0,76
0,08	0,31	0,76	0,18	0,38	0,49	0,98
0,1	0,07	0,49	0,19	0,46	0,26	0,70

**Figura 15:** Separação em coluna de oligossacarídeos (•), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,06\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $E = 60\%$ e 50°C .**Figura 16:** Separação em coluna de oligossacarídeos (•), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,08\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $E = 60\%$ e 50°C .

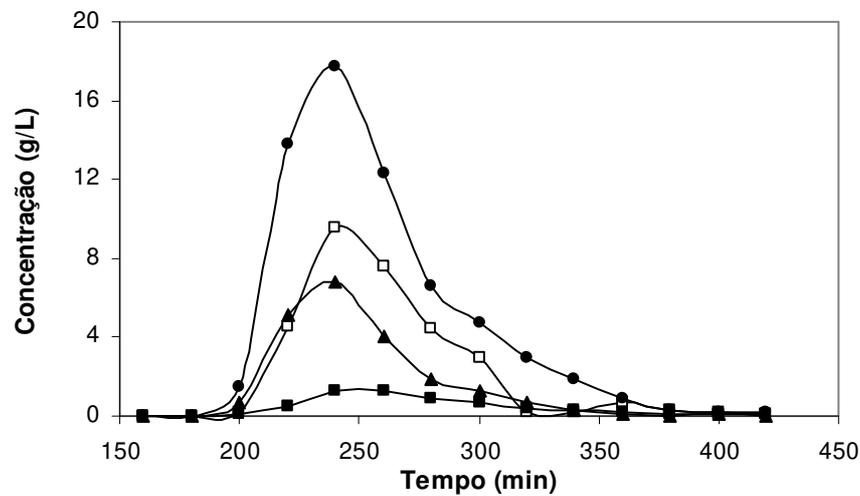


Figura 17: Separação em coluna de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com vazão de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $E = 60\%$ e 50°C .

Através da análise dos ensaios apresentados na Tabela 17, pode ser observado que a melhor eficiência de separação foi obtida quando a solução de açúcar foi injetada numa vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, mas que a vazão de $0,06 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentou uma eficiência de separação semelhante. Portanto na continuação do estudo foram montadas duas colunas em série, sendo mantida a temperatura em 50°C , volume injetado em 1 mL, concentração de etanol 60% (v/v) e vazões de $0,06$ e $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

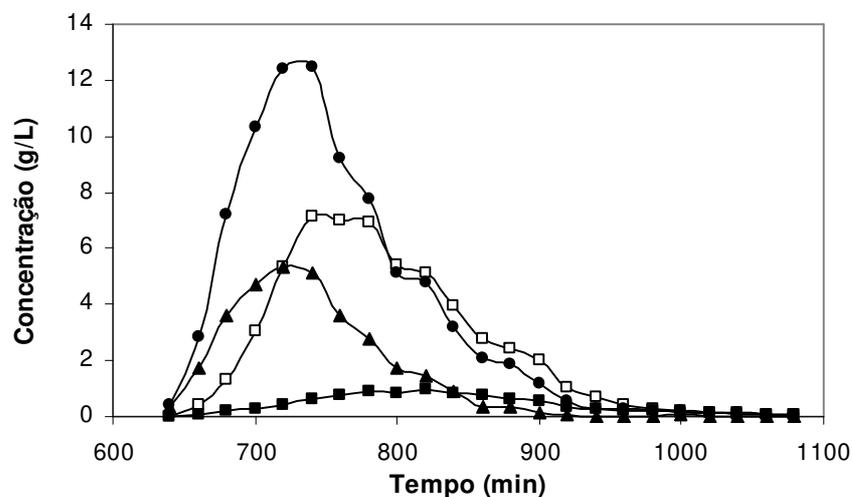
4.5. SEPARAÇÃO DE AÇÚCARES COM DUAS COLUNAS EM SÉRIE

Devido a utilização de uma só coluna não ter se mostrado eficiente na separação dos açúcares, foi utilizado no experimento seguinte, duas colunas idênticas em série, todas com 50 cm de leito. Os ensaios foram realizados nas vazões que apresentaram a melhor eficiência de separação nos ensaios anteriores ($0,06$ e $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Os resultados estão apresentados na Tabela 18 e nas Figuras 18 e 19.

Tabela 18: Eficiência de separação entre açúcares com duas colunas em série.

Vazão (mL.min ⁻¹)	ES _{olig/glic}	ES _{olig/frut}	ES _{olig/sac}	ES _{glic/frut}	ES _{glic/sac}	ES _{frut/sac}
0,06	0,53	1,01	0,26	0,52	0,83	1,32
0,08	0,55	1,00	0,16	0,49	0,73	1,20

Analisando a Tabela 18, observa-se que a eficiência de separação encontrada nas vazões de 0,06 e 0,08 mL.min⁻¹ foi semelhante, como ocorreu no ensaio realizado com uma coluna. Através do aumento do número de colunas no processo houve uma melhora na separação dos açúcares, com a utilização de uma coluna a eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,31 e com duas colunas em série foi calculada uma eficiência de 0,55, quando utilizada vazão de 0,08 mL.min⁻¹, esta melhora na separação também foi observada para os outros açúcares estudados. Podendo ser explicada pelo aumento do tempo de residência da solução de açúcares na coluna.

**Figura 18:** Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com duas colunas em série, com vazão de 0,06 mL.min⁻¹.

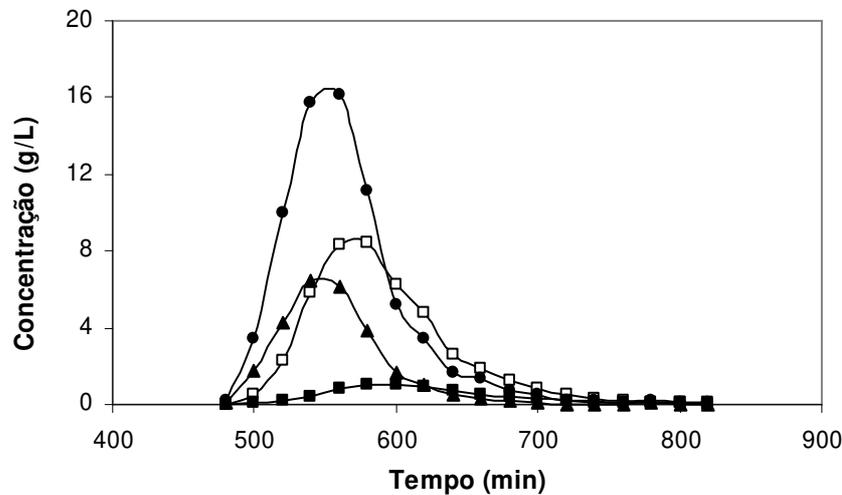


Figura 19: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com duas colunas em série, com vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Como a resposta eficiência de separação entre os açúcares foi semelhante nas duas vazões estudadas, optou-se pela vazão de $0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para a realização dos estudos em triplicata, devido a esta vazão tornar o processo mais rápido.

Na Tabela 19 podem ser visualizados os resultados das eficiências de separação entre os açúcares com o respectivo erro padrão. Observando os resultados encontrados verifica-se que os resultados apresentaram repetibilidade, devido ao erro padrão encontrado ser relativamente pequeno, demonstrando o controle do processo.

Tabela 19: Eficiência de separação dos açúcares com duas colunas em série, $T = 50^{\circ}\text{C}$, $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $V = 1 \text{ mL}$, $E = 60\%$.

Ensaio	$ES_{\text{olig/glic}}$	$ES_{\text{olig/frut}}$	$ES_{\text{olig/sac}}$	$ES_{\text{glic/frut}}$	$ES_{\text{glic/sac}}$	$ES_{\text{frut/sac}}$
1	0,55	1,00	0,16	0,49	0,73	1,20
2	0,62	1,00	0,20	0,41	0,85	1,24
3	0,63	0,99	0,22	0,39	0,88	1,25
Média*	$0,60 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,08$	$1,23 \pm 0,03$

* \pm erro padrão – os resultados representam a média de 3 ensaios.

4.6. SEPARAÇÃO DE AÇÚCARES COM TRÊS COLUNAS EM SÉRIE

Neste experimento foram utilizadas três colunas em série, o experimento foi realizado nas vazões de 0,06 e 0,08 mL.min⁻¹, mantendo-se as demais variáveis inalteradas. A montagem experimental das colunas está representada na Figura 20. Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 20 e Figuras 21 e 22.

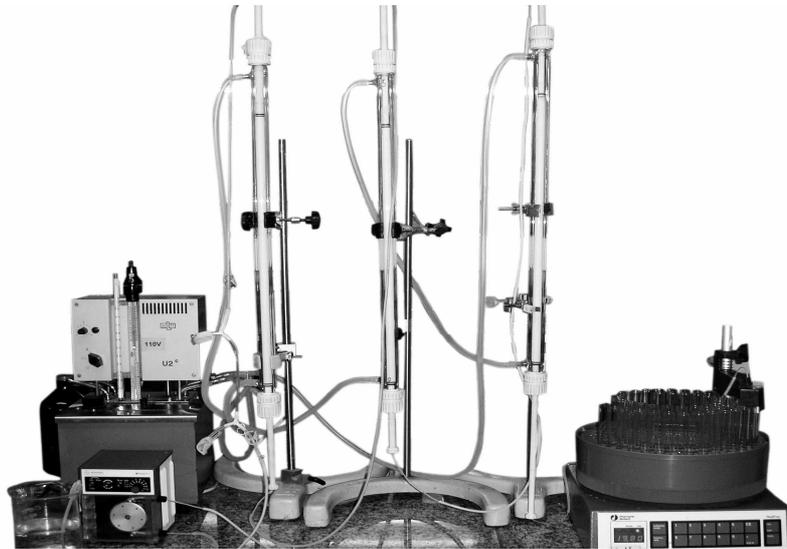


Figura 20: Montagem experimental das colunas em série.

Tabela 20: Eficiência de separação com três colunas em série variando a vazão.

Vazão (mL.min ⁻¹)	ES _{olig/glic}	ES _{olig/frut}	ES _{olig/sac}	ES _{glic/frut}	ES _{glic/sac}	ES _{frut/sac}
0,06	0,50	0,84	0,33	0,39	0,88	1,22
0,08	0,43	0,72	0,23	0,33	0,68	0,97

Analisando os resultados apresentados na Tabela 20, observa-se que a eficiência de separação calculada entre os açúcares não foi melhorada com a utilização de três colunas, com exceção da eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e sacarose. Essa diminuição na eficiência de separação com a utilização de três colunas pode ser explicada pelos problemas apresentados na terceira coluna, apresentando, após algum tempo de operação, caminhos preferenciais, dificultando a eluição da solução de açúcares. Estes ensaios foram repetidos para a confirmação das respostas.

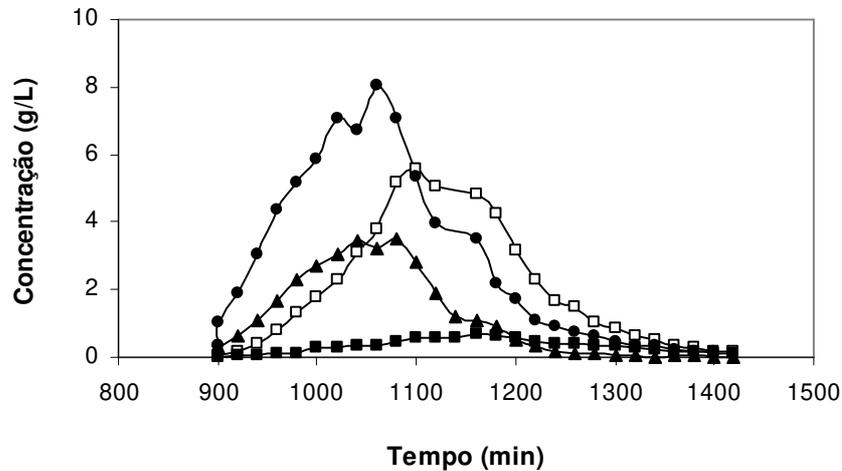


Figura 21: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com três colunas em série, com vazão de 0,06 mL.min⁻¹.

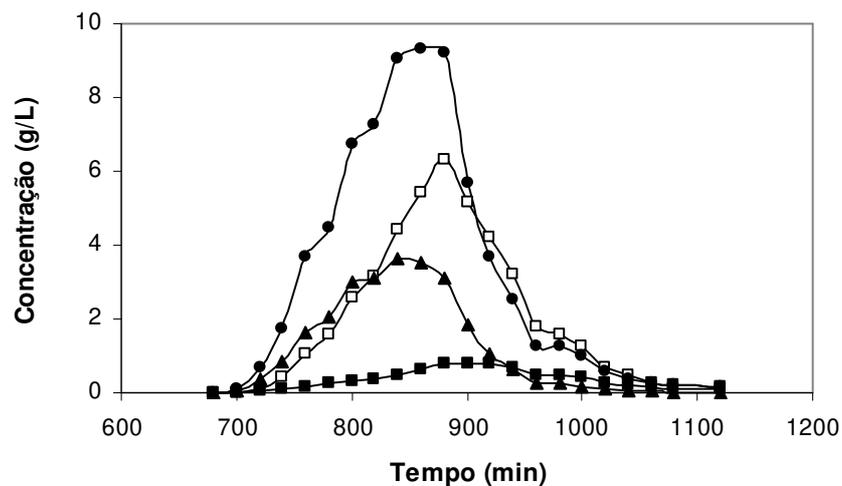


Figura 22: Separação de oligossacarídeos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲) com três colunas em série, com vazão de 0,08 mL.min⁻¹.

Percebe-se que a eficiência de separação com três colunas em série quando foi usada uma vazão de 0,06 mL.min⁻¹, foi semelhante a eficiência encontrada na vazão de 0,08 mL.min⁻¹, como aconteceu anteriormente no ensaio com uma e duas colunas em série. Portanto, define-se que a vazão de 0,08 mL.min⁻¹ é a mais adequada, já que uma vazão mais baixa como a de 0,06 mL.min⁻¹ não melhorou de forma significativa a separação. Com a vazão de 0,08 mL.min⁻¹ o processo é mais rápido, não comprometendo desta maneira a eficiência de separação.

O ensaio com três colunas em série foi realizado em triplicata, onde foi verificado que a eficiência de separação encontrada não foi melhorada através do aumento do leito, resultados estes visualizados na Tabela 21. Não foi obtida uma melhora na eficiência de separação entre os açúcares como foi conseguida através da utilização de duas colunas, com exceção da separação entre oligossacarídeos e sacarose e entre glicose e frutose, este resultado pode ser explicado pelo aumento da perda de carga com a utilização de três colunas. Sendo assim, conclui-se que a melhor separação foi obtida com duas colunas em série, nas condições em que foram realizados os estudos.

Tabela 21: Eficiência de separação entre açúcares com três colunas em série, $T = 50^{\circ}\text{C}$, $v = 0,08 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $V = 1 \text{ mL}$, $E = 60\%$.

Ensaio	$ES_{\text{olig/glic}}$	$ES_{\text{olig/frut}}$	$ES_{\text{olig/sac}}$	$ES_{\text{glic/frut}}$	$ES_{\text{glic/sac}}$	$ES_{\text{frut/sac}}$
1	0,43	0,72	0,23	0,33	0,68	0,97
2	0,46	0,90	0,23	0,46	0,71	1,17
3	0,44	1,08	0,37	0,63	0,85	1,54
Média*	$0,44 \pm 0,015$	$0,90 \pm 0,18$	$0,28 \pm 0,08$	$0,47 \pm 0,15$	$0,75 \pm 0,09$	$1,23 \pm 0,29$

* \pm erro padrão – os resultados representam a média de 3 ensaios.

Em estudo realizado por Burkert (2003) na separação de dextrana e frutose foi conseguida uma eficiência de separação de 2,72, resultado este superior ao encontrado neste trabalho onde a separação entre oligossacarídeos e frutose foi 1,00. Burkert (2003) obteve esta eficiência de separação utilizando concentração de 20 g/L e 40°C , onde a dextrana utilizada possuía peso molecular 9300, este elevado peso molecular pode ter facilitado a separação, devido a molécula de dextrana ser maior que o poro da zeólita, sendo a frutose retida pela zeólita e a dextrana excluída. Também pode ter contribuído para este resultado o diâmetro de partícula utilizado por Burkert (2003), sendo de 53-125 μm e neste trabalho foram utilizadas zeólitas de diâmetro de partícula de 177-210 μm .

4.7. COMPARAÇÃO ENTRE AS EFICIÊNCIAS DE SEPARAÇÃO

Através deste estudo pode ser observado que houve uma melhora na eficiência de separação através da mudança de alguns níveis das variáveis estudadas. Os ensaios foram realizados a 50°C , volume injetado na coluna foi de 1 mL e vazão de alimentação de 0,08

mL.min⁻¹. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 23, onde inicialmente na separação foi utilizada uma coluna e eluente etanol 50% (v/v), nos ensaios seguintes foi feita uma mudança no eluente utilizado sendo este etanol 60% (v/v), verificando-se a melhora na separação (Figura 13). Esta melhora também pôde ser visualizada através do aumento do tamanho do leito, visto que uma só coluna não foi eficiente na separação e que o processo poderia ser melhorado através da utilização de colunas em série (Figura 23).

Quando comparada a eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose, observa-se que inicialmente quando foi utilizada uma coluna a eficiência foi de 0,31, e quando a eficiência foi calculada utilizando duas colunas foi de 0,60, sendo verificado uma melhora de 93%.

Na resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e frutose, inicialmente obteve-se uma eficiência de 0,76 quando foi utilizada uma coluna, já quando foram utilizadas duas colunas a eficiência de separação calculada foi de 1,00, observando-se uma melhora de 32%.

Na resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e sacarose, não foi observada uma melhora significativa com o aumento do tamanho do leito, inicialmente se obteve uma separação de 0,18 com uma coluna e com três colunas em série obteve-se uma eficiência de 0,23, a melhora foi de 27%. Mas, este problema pode ser minimizado através do aumento do tempo de síntese na obtenção dos frutooligossacarídeos, sendo assim, a sacarose seria praticamente inexistente ao final da síntese, apresentando somente traços de sacarose na mistura de açúcares, não necessitando a realização da etapa de separação.

A eficiência de separação entre glicose e frutose era inicialmente de 0,27 com a utilização de uma coluna e utilizando etanol 50% (v/v) como eluente, com a utilização de duas colunas em série obteve-se uma eficiência de 0,43, a melhora no processo foi de 59%.

A eficiência de separação entre glicose e sacarose e entre frutose e sacarose foi inicialmente de 0,49 e 0,98, respectivamente, quando se utilizou somente uma coluna, sendo que com a utilização duas colunas em série, foram conseguidas eficiências de 0,82 para glicose

e sacarose e de 1,23 para frutose e sacarose, apresentando melhoras de 67% e 26%, respectivamente.

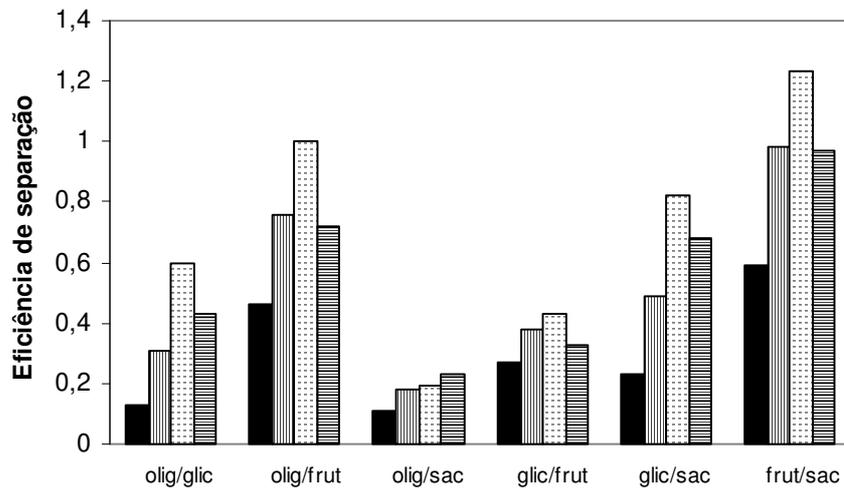


Figura 23: Eficiência de separação utilizando E = 50%(v/v) com uma coluna (■), E = 60% (v/v) com uma coluna (▨), E = 60% (v/v) com duas colunas (▩) e E = 60% (v/v) com três colunas (▧), T = 50°C, v = 0,08 mL.min⁻¹, V = 1 mL.

5. CONCLUSÕES

A etapa de síntese dos frutooligossacarídeos foi realizada durante 72 horas, com um rendimento de produção de frutooligossacarídeos de 52%.

Os ensaios preliminares definiram que a zeólita utilizada teria diâmetro de partícula entre 177-210 μm e a amostra concentração inicial de 250 g/L de açúcares.

Através do planejamento experimental fracionário 2^{4-1} , verificou-se que dentre as variáveis estudadas, volume de açúcar injetado na coluna, temperatura, vazão de alimentação e concentração de etanol, somente a vazão de alimentação foi significativa a nível de significância de 10%, para a resposta eficiência de separação entre oligossacarídeos e glicose.

Quando foi analisada a resposta eficiência de separação entre glicose e frutose, e entre oligossacarídeos e frutose foi observado que as variáveis, temperatura, vazão e concentração de etanol apresentaram efeitos significativos, sendo que a concentração de etanol teve efeito positivo e a temperatura e vazão efeitos negativos a nível de significância de 10%.

Através dos ensaios com colunas de leito fixo em série verificou-se que o aumento do tamanho do leito e da concentração de etanol beneficiaram a eficiência de separação. Quando foram realizados ensaios com duas colunas em série foram obtidos os melhores resultados na separação. A eficiência de separação calculada entre oligossacarídeos e glicose foi de 0,60, entre oligossacarídeos e frutose de 1,00, entre oligossacarídeos e sacarose de 0,19, entre glicose e frutose de 0,43, entre glicose e sacarose de 0,82 e entre frutose e sacarose de 1,23.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ensaio de adsorção com zeólitas trocadas com outros cátions de compensação, visando a adsorção preferencial de glicose, visto que este açúcar encontra-se em concentração elevada na mistura de açúcares obtida na síntese enzimática.

A utilização de carvão ativo como adsorvente de colunas de separação, visto que o carvão é uma alternativa na separação dos frutooligossacarídeos, tendo demonstrado resultados promissores em alguns trabalhos, em vista de que diâmetros de partículas menores podem ser utilizados na separação dos açúcares.

A utilização de carvão ativo e celite como adsorventes em colunas de leito fixo para purificação de açúcares, apresentando-se como uma alternativa de separação nesta área.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOSOVÁ; M., POLAKOVIC; M. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, p. 350-358, 2001.

ARUNACHALAM, K. Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, p. 1559-1597, 1999.

BADILLO-ALMARAZ, V.; TROCELLIER, P. DAVILA-RANGEL, I. Adsorption of aqueous Zn(II) species on synthetic zeolites. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, B 210, p. 424-428, 2003.

BEKER; M., LAUKEVICS; J.; UPITE; D., KAMINSKA; E., VIGNATS; A., VIESTURS, U. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* and extracelular levan sucrose. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 701-706, 2002.

BEKERS; M., MARAUSKA; M., GRUBE; M., KLARKLINA; D., DUMA; M. New prebiotics for functional food. **Acta Alimentaria**, v. 33, p. 31-37, 2004.

BERENSMEIER, S.; BUCHHOLZ, K. Separation of isomaltose from high sugar concentrated enzyme reaction mixture by dealuminated β -zeolite. **Separation and Purification Technology** v. 38, p.129-138, 2004.

BEUCHAT, L. R. **Food and beverage mycology**. Westpot: Avi, 527p, 1978.

BHATIA, S. **Zeolite catalysis**: Principles and applications. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1946. Chap. 2: Zeolite composition and structure: p. 7-18.

BOON; M. A., VAN'T RIET; K., JANSSEN; A. E. M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 4, p. 411-420, 2000.

BORGES; V. C. **Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos**. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu, 2001.

BOX; G. E. P., HUNTER; W. E. e HUNTER; J. S. **Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building**. Wiley New York, 1978.

BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves: Structure, chemistry and use**. New York: John Willey & Sons, Inc., 1974. 771 p.

BROCKLEBANK; M. P. Downstream processing plant and equipment. In: ASENJO; J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. New York, Marcel Dekker Inc., p. 617-740, 1990.

BURKERT, C. A. V. **Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas**. 2003, 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BUTTERSACK, C.; WACH, W.; BUCHHOLZ, K. Specific adsorption of saccharides by dealuminated Y-zeolites. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 46, p. 11861-11864, 1993.

BUTTERSACK; C. RUDOLPH; H., MAHRHOLZ; J., BUCHHOLZ; K. High specific interaction of polymers with the pores of hydrophobic zeólitas. **American Chemical Society**, v. 12, n. 13, p. 3101-3106, 1996.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.**, 71 p. 41-44, 2000.

CATLOW; C. R. A. **Modelling of Structure and Reactivity in Zeolites**. London, Academic Press, p. 260, 1992.

CAVENAGHI, M. E.; MAUGERI, F. Estudo da recuperação de frutose produzida por síntese enzimática “in vitro” de dextrana. XII Simpósio Nacional de Fermentações, 1999.

- CHEN, W. & LIU, C. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.02, p.153-160, 1996.
- CHENG, Y. L. & LEE, T. Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 4, p. 498-504, 1992.
- CHERBUT; C. Inulin and oligofructose in the dietary fiber concept. **British Journal of Nutritional**, v. 87, p. 159 – 162, 2002.
- CHIANG; C. J., LEE; W. C., SHEU; D. C., DUAN; K. J. Immobilization of β -fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 577-582, 1997.
- CHIEN; C. S., LEE; W. C., LIN; T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 29, p. 252-257, 2001.
- CHING, C. B.; HIDAJAT, K.; RUTHVEN, D. M. Experimental study of simulated counter-current adsorption system – V. Comparison of resin and zeolite absorbents for fructose-glucose separation at a high concentration. **Chemical Engineering Science**, v. 42, n. 11, p. 2547-2555, 1987.
- CHING, C. B. & RUTHVEN, D. M. A liquid phase chromatographic study of sorption and diffusion of glucose and fructose in NaX and KX zeolite crystals. **Zeolites**, v. 8, n. 1, p. 68-73, 1988.
- CRITTENDEN, R. G. & PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides, **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 353-361, 1996.
- DUAN; K. J., SHEU; D. C., CHEN; J. S. Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1811-1815, 1993.

FERNÁNDEZ; R. C., MARESMA; B. G., JUÁREZ; A., MARTÍNEZ; J. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 268-272, 2004.

FLANIGEN; E. M. **Zeolites and molecular sieves: an historical perspective**. In: VANBEKKUM, H. FLANIGEN, E. M., JANSEN, J. C. Introduction to zeolite science and practice: studies in surface science and catalysis. Amsterdam: Elsevier, v. 58, chap. 2, p. 13-33, 1991.

FLICKINGER; E. A., LOO; J. V., FAHEY; G. C. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 19-60, 2003.

GIANETTO; G. P. **Zeolitas: Características, propiedades y aplicaciones industriales**. Edit – Editorial Innoreación Tecnológica, caracas, 1990.

GUPTA, A.; GAUR, V.; VERMA, N. Breakthrough analysis for adsorption of sulfur-dioxide over zeolites. **Chemical Engineering and Processing**, v. 0, p. 1-14, 2003.

HANG; Y. D., WOODAMS; E. E., JANG, K. Y. Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v.17, n 3, p. 295 – 298, 1995.

HARTEMINK, R. Non-digestible oligosaccharides: healthy food for the colon? **Proceedings of the International Symposium "Non-digestible oligosaccharides: healthy food for the colon?"** Holanda – Netherlands, 1997.

HASHIMOTO; K. ADACHI; S., NOUJIMA; H. Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, p. 400-406, 1983.

HAYASHI; S., YOSHIYAMA; T., FUJI; N., SHINOHARA, S. Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrium*. **Biotechnology Letters**, v. 22, v. 1465-1469, 2000.

HAYASHI; S., NONOGUCHI; M., SHIMOKAWA; Y., TUBOUCHI; M. TAKASAKI; Y., IMADA; K Purification and properties of extracellular β -fructofuranosidases from *Aureobasidium* sp. ATCC 0524. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** , v. 9, n. 2, p. 145 – 147, 1992.

HAYASHI; S., NONOGUCHI; M., TAKASAKI; Y., UENO; H. IMADA; K. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 251-256, 1991.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras.** Doutorado em andamento, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HICKE; H., ULBRICHT; M., BECKER; M., RADOSTA; S., A. HEYER; G.; Novel enzyme-membrane reactor for polysaccharide synthesis. **Journal of Membrane Science**, v. 161, p. 239 – 245, 1999.

HIDAKA; H., TASHIRO; Y., EIDA; T. Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and their useful effect on human health. **Bifidobacteria Microflora**, v. 10, p. 65-79, 1991.

HIDAKA; H., HIRAYAMA; M., SUMI; N. A fructooligosaccharides-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agric. Biol. Chem.** v. 52, n. 5, p. 1181-1187, 1988.

HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKUNAGA, T.; TASIDO, Y.. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v.5, p. 37-50, 1986.

HO, C.; CHING, C.; RUTHVEN, D. M. A comparative study of zeolite and resin adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 26, n. 7, p. 1407-1412, 1987.

JORGENSEN, T. C. Ammonia removal from wastewater by ion exchange in the presence of organic contaminants, **Water Research**, v. 37, p. 1723-1728, 2003.

KAPLAN; H. & HUTKINS; R. W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobactéria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2682 – 2684, 2000.

KÄRGER; J. & RUTHVEN; D. M. **Diffusion in zeólitas: and other microporous solids**. New York: John Willey & Sons, Inc., p. 605, 1991.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1082p, 1987.

L'HOCINE, L.; WANG, Z.; JIANG, B.; XU, SHIYING; Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023, **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 73 – 84, 2000.

LIN; S. C. & LEE; W. C., Separation of fructo-oligosaccharide mixture by hydrophilic interaction chromatography using silica-based micropellicular sorbents. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 803, n. 1-12, p. 302-306, 1998.

LORENÇO, C. M. **Desenvolvimento de Processo Contínuo de Obtenção de Frutose a partir de Sacarose**. 2004, 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LU, T. S.; LEE, T. Y. Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. **Industrial Engineering Chemistry Research**, Columbus, v. 26, n. 10, p. 2024-2028, 1987.

MARTINELLI, A. L. S., MACHADO, N. R. C., ZANIN, G. M. Separation of glucose and fructose mixture by adsorption on zeólitas. In: XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

MENDES, G. L. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MIZOTA, T; Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. **Bolletín of the International Dairy Federation**, n. 313, p. 31-35, 1996.

MODLER, H. W.; MCKELLAR, R. C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.23, n.01, p.29-41, 1990.

MOSCOU, L. The zeolite scene. In: VAN BEKKUM; H., FLANIGEN; E. M., JANSEN; J. C. **Introduction to zeolite science e practice**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 58 Chap. 1, p. 1-12. (Studies in surface science and catalysis).

NELSON, N, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal Biological Chemical**, v. 153, p 375-380, 1944.

O`SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – An overview **Bulletin of International Dairy Federation**, v.313, p.23-30, 1996.

PARK; J. OH; T., YUN; J. W. Purification and characterization of a novel transfructosylation enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 471 – 476, 2001.

PASSOS; L. M. L. & PARK; Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. Aspen Publishes, Inc., Gaithersburg, 593p, 1999.

REMAUD-SIMEON, M.; LOPEZ-MUNGUÍA, A.; PELENC, V.; PAUL, F.; MONSAN, P. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1,2) linkages. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.44, n.02, p.101-117, 1994.

ROBERFROID; M. & DELZENNE; N. M. Dietary Fructans. **Annual Review Nutritional.**, v. 18, p. 117-143, 1998.

ROBERFROID; M. Dietary fiber, inulin and oligosaccharides: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 103-108, 1993.

RODRIGUES; M. I. & IEMMA; A. F **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª edição. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326 p.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **Biology of Yeasts**. Volume 1. Academic Press, London, 508p, 1969.

RUTHVEN; D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. New York, John Willey & Sons, Inc., p. 433, 1984.

RYCROFT; C. E., JONES; M. R. GIBSON; G. R., RASTALL; R. A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 878-887, 2001.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 442 – 457, 2005.

SANGEETHA; P.T; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 57–64, 2004.

SANGEETHA; P. T., RAMESH; M. N., PRAPULLA; S. G. Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyl transferase and fructooligosaccharides. **Science Des Aliments**, v. 22, p. 277-287, 2002.

SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus***. 2002, 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de

Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SANTOS; T. M. A. **Estudo da recuperação do xilitol produzido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando zeólitas**. 2004. 99f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W. D.; GLÄSER, B. Liquid-phase adsorption of monosaccharide-water mixtures on X and Y zeolites. **Journal of Chemical Society-Faraday Transactions**, v. 89, n. 11, p. 1871-1876, 1993.

SHEU; D. C., LIO; P. J., CHEN; S. T., LIN; C. T., DUAN; K. J. Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1499-1503, 2001.

SILVA, C. F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose**. 1998, 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemical**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SPIEGEL, J.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, v. AND SCHMITT, D., F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, jan., p. 85-89, 1994.

SQUINA, F. M. **Estudos com carotenóides de leveduras do gênero Rhodotorula: Desenvolvimento de método analítico, influência de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana de açúcar**. Campinas, 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

TAKAHASHI; Y. & GOTO; S. Continuous separation of fructooligosaccharides using an annular chromatograph. **Separation Science and Technology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1311-1318, 1994.

TAKEDA; H., SATO; K., KINOSHITA; S., SASAKI; H. Production of 1-kestose by *Scopulariopsis brevicaulis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 386-389, 1994.

TREICHEL, H. **Estudo de meios industriais para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* ATCC 16045**. Campinas, 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

VARANDA, C. S. **Produção, separação e purificação de oligossacarídeos obtidos por síntese enzimática**. Relatório de iniciação científica, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

WILLIAMS; C. M. & JACKSON; K. G. Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 261-264, 2002.

YAMASHITA; K., KAWAI; K., ITAKURA; M. Effects of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v. 4, p. 961-966, 1984.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides: Occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n.02, p. 107-117, 1996.

YUN; J. W. & SONG; S. K. The production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 573-576, 1993.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: Perspectives and futures strategies. **International Dairy Journal**, v.8, n.5-6, p.473-479, 1998.

8. ANEXOS

Gráficos do Planejamento Experimental Fracionário

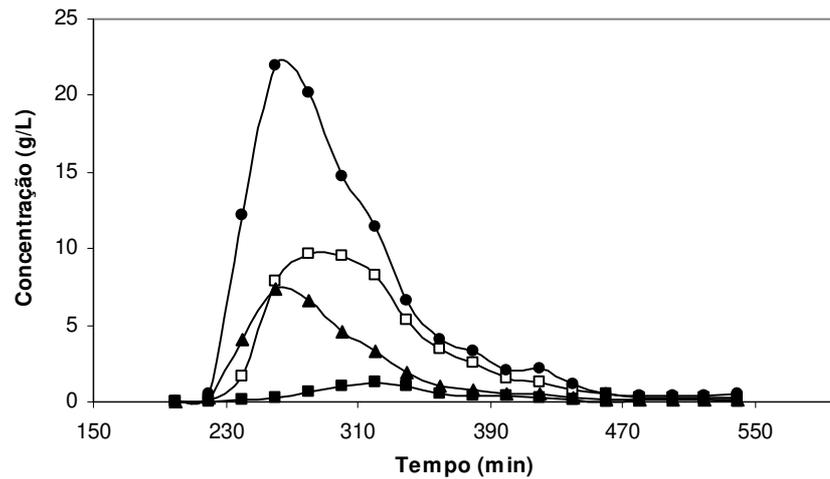


Figura 24: Ensaio 1. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

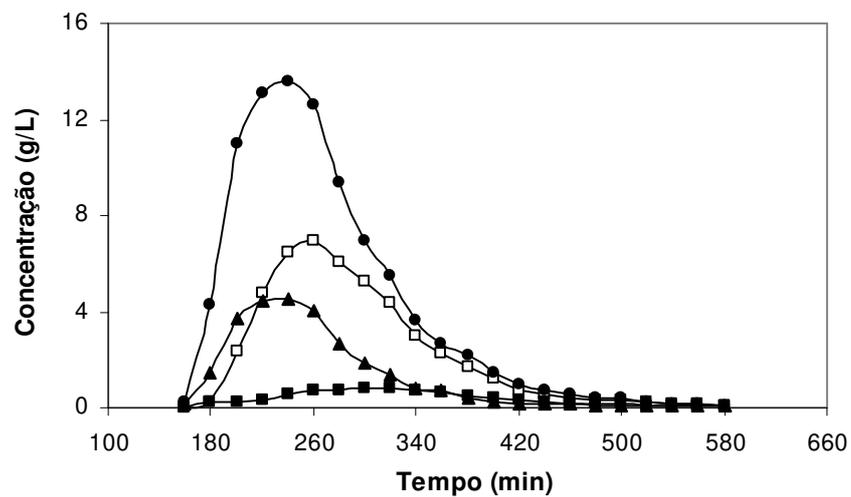


Figura 25: Ensaio 2. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

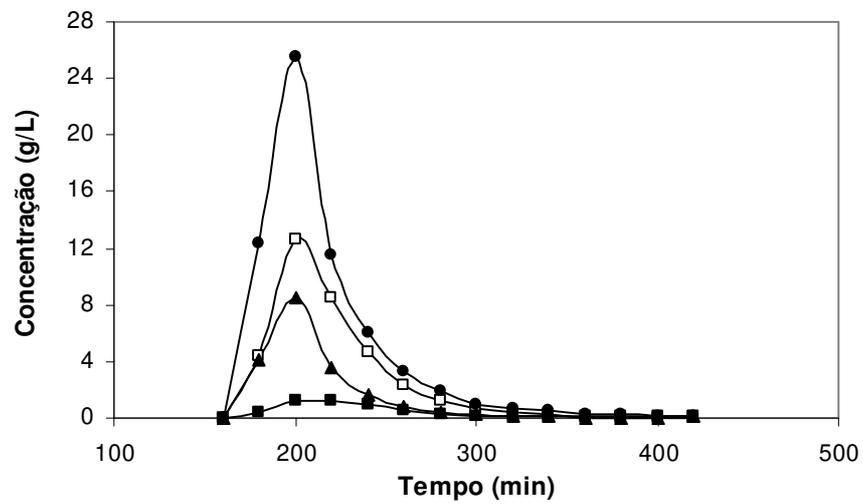


Figura 26: Ensaio 3. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

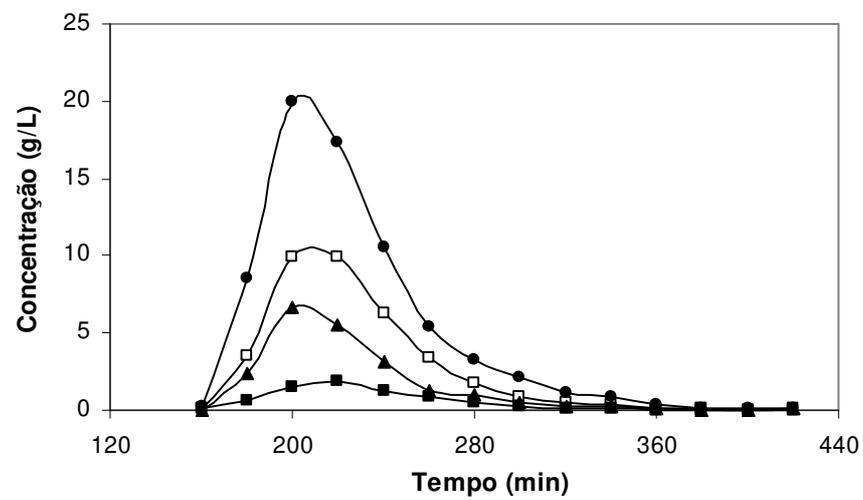


Figura 27: Ensaio 4. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

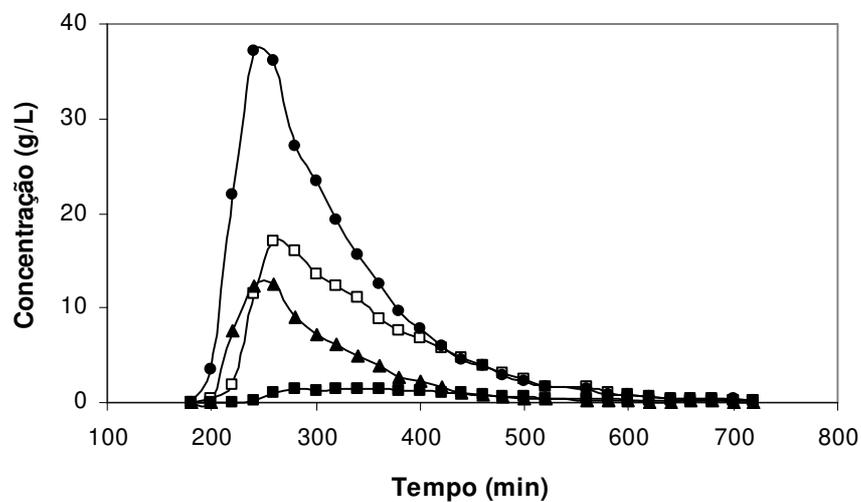


Figura 28: Ensaio 5. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

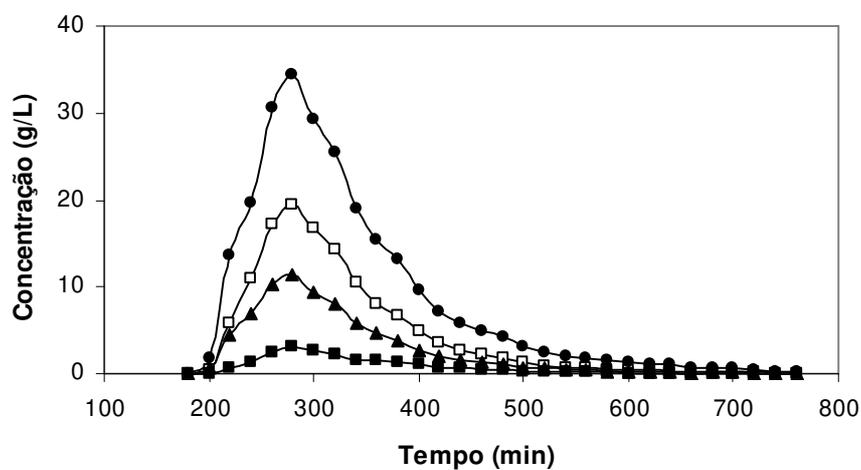


Figura 29: Ensaio 6. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

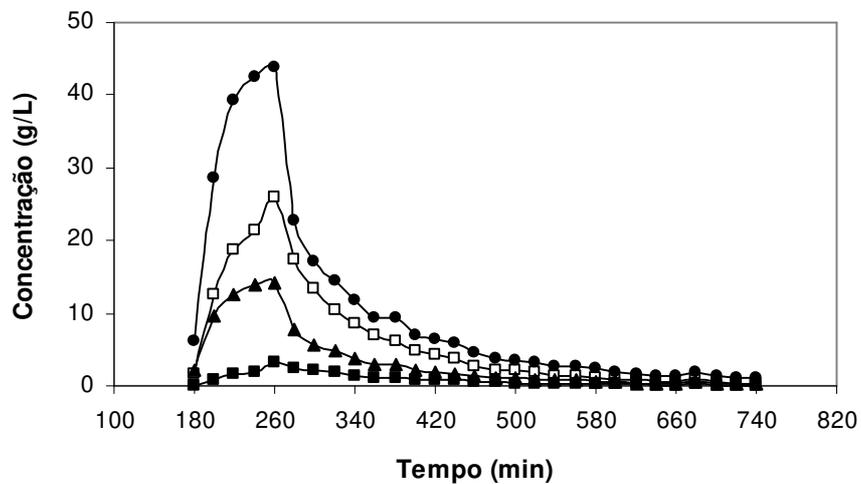


Figura 30: Ensaio 7. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

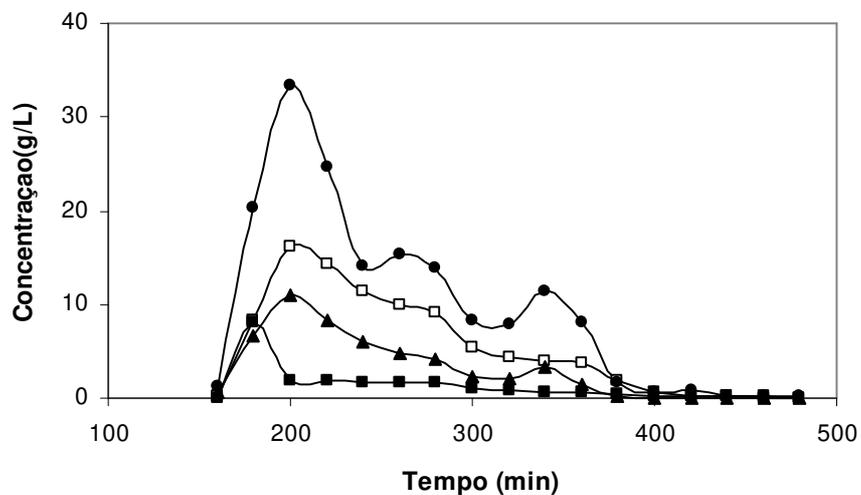


Figura 31: Ensaio 8. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

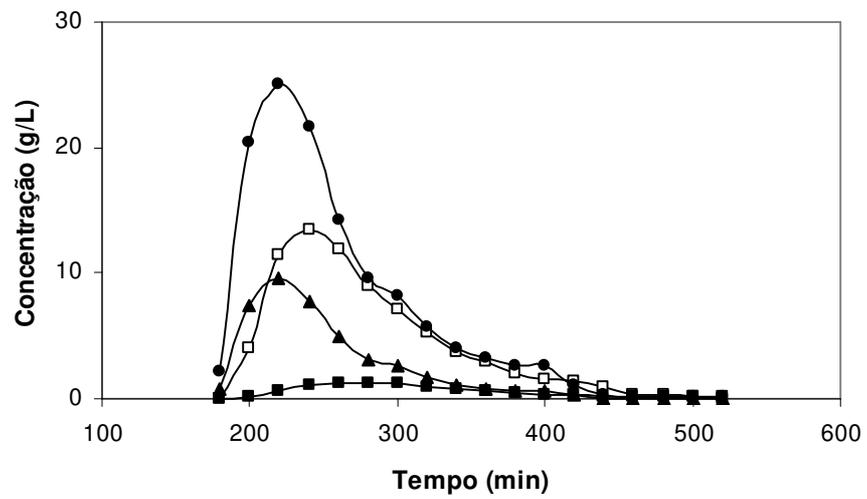


Figura 32: Ensaio 9. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

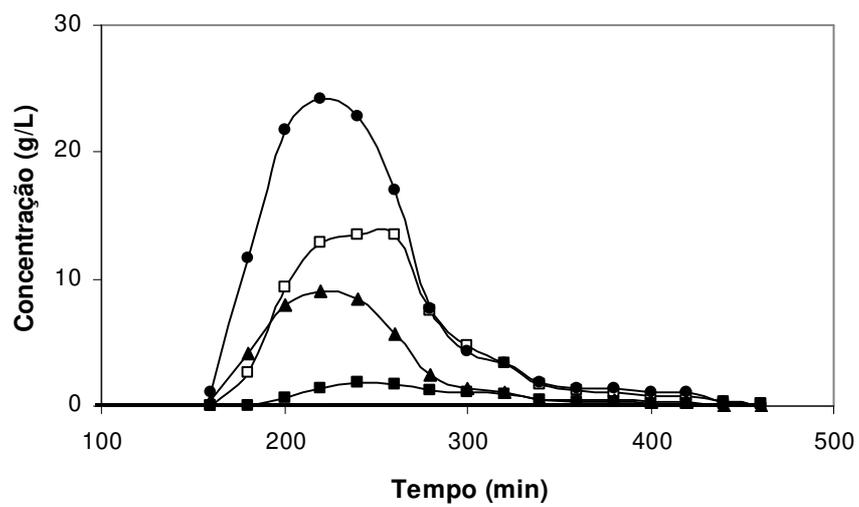


Figura 33: Ensaio 10. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

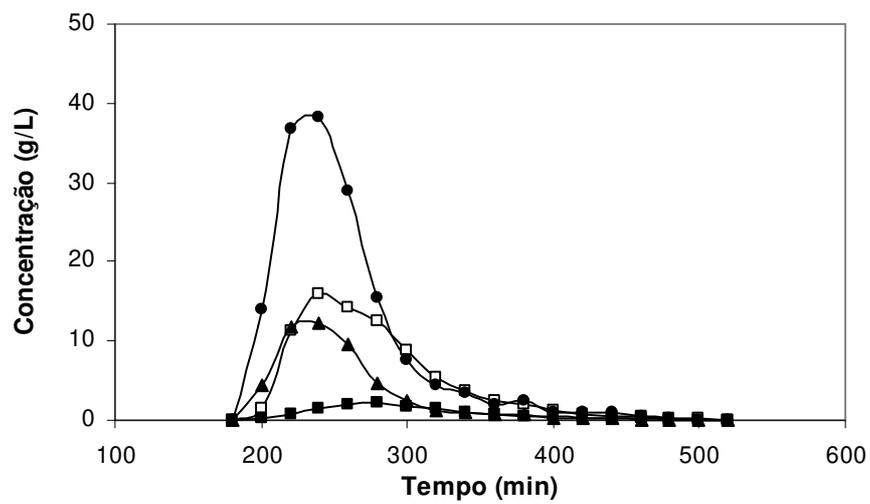


Figura 34: Ensaio 11. Separação de oligos (●), glicose (□), frutose (■) e sacarose (▲).

Cromatogramas – HPLC (PAD)

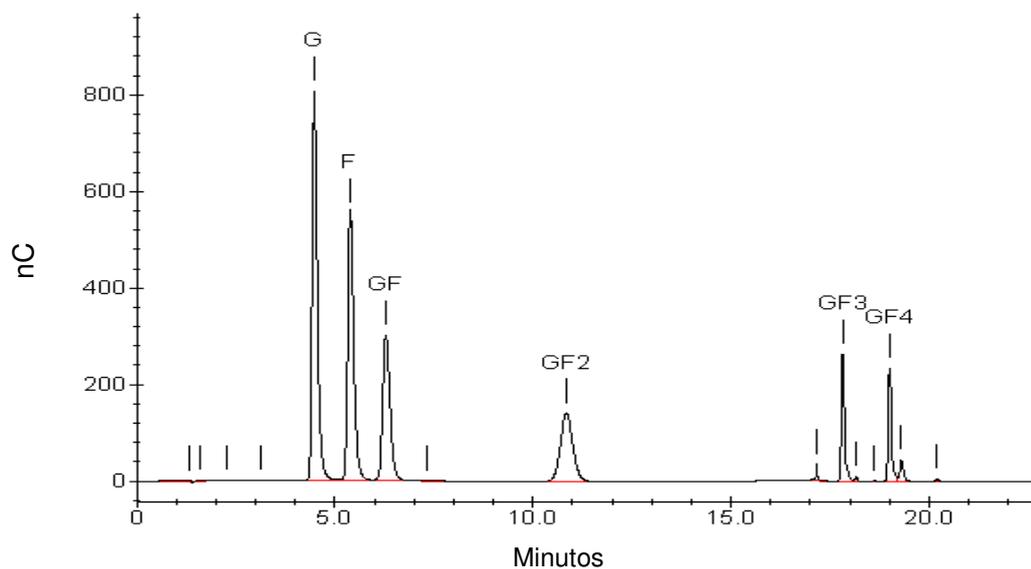


Figura 35: Cromatograma dos padrões 30% de glicose (G), frutose (F), sacarose (GF), kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosilnystose (GF₄).

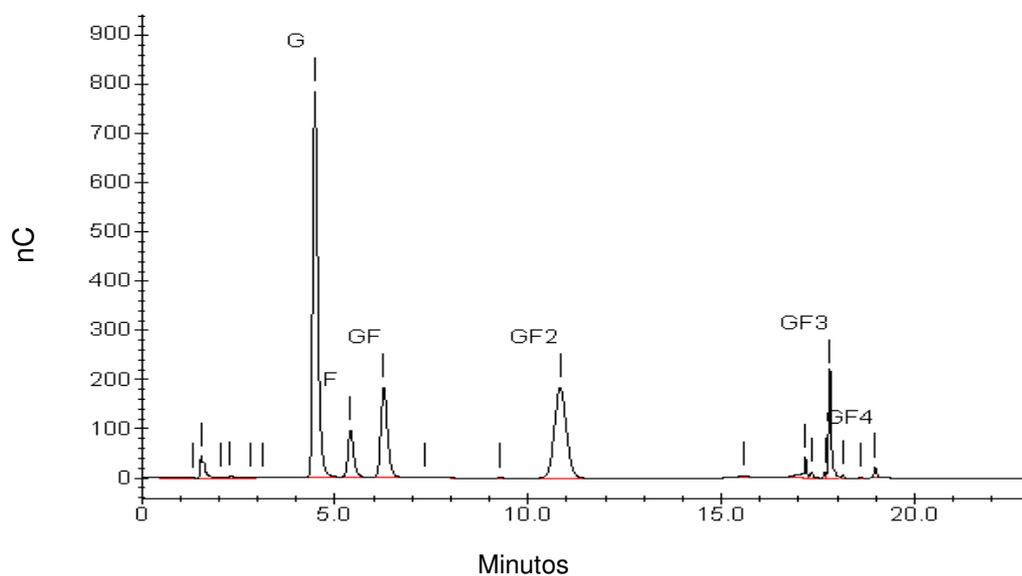


Figura 36: Cromatograma da síntese de 72 horas dos frutooligossacarídeos.