



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPT. DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ELIZAMA AGUIAR-OLIVEIRA
Engenheira de Alimentos

**ESTUDOS SOBRE AS PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA
FRUTOSILTRANSFERASE DE *RHODOTORULA* sp. LIVRE E
IMOBILIZADA EM SUPORTE INORGÂNICO**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutora em Engenharia de Alimentos

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado defendida por Elizama Aguiar de Oliveira, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

**Campinas - SP
Janeiro 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Ag93e Aguiar-Oliveira, Elizama, 1978-
Estudos sobre as propriedades catalíticas da frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. livre e imobilizada em suporte inorgânico / Elizama Aguiar-Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

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

1. Arrhenius. 2. Delineamento Fatorial Fracionado.
3. Fruto-oligossacarídeos. 4. Liofilização. 5. Nióbio. I.
Maugeri, Francisco. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Catalytic properties of fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp., free and immobilized on inorganic support

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Arrhenius Plot

Fractional Factorial Design

Fructoligosaccharides

Lyophilization

Niobium

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Eloízio Júlio Ribeiro

Gabriela Alves Macedo

Jonas Contiero

Telma Maria Franco

Data da defesa: 13/02/2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador – FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Membro – FEQUI/UFU

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Membro – FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Jonas Contiero
Membro – IB/UNESP-RC

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco
Membro – FEQ-UNICAMP

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
Suplente – FZEA/USP

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa
Suplente – FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Suplente – FEA/UNICAMP

“Em memória” de todos os dados sofridamente obtidos e cruelmente não publicados...

:P

v

Sugestão

Cecília Meireles – Mar Absoluto (1945)

Sêde assim – qualquer coisa
serena, isenta, fiel.

Flor que se cumpre,
sem pergunta.

Onda que se esforça,
por exercício desinteressado.

Lua que envolve igualmente
os noivos abraçados
e os soldados já frios.

Também como este ar da noite:
sussurrante de silêncios,
cheio de nascimentos e pétalas.

Igual à pedra detida
sustentando seu demorado destino.
E à nuvem, leve, e bela,
vivendo de nunca chegar a ser.

À cigarra, queimando-se em música,
ao camelo que mastiga sua longa solidão,
ao pássaro que procura o fim do mundo,
ao boi que vai com inocência para a morte.

Sêde assim qualquer coisa
serena, isenta, fiel.

Não como o resto dos homens.

Metade

Oswaldo Montenegro – João Sem Nome (1975)

Que a força do medo que tenho
Não me impeça de ver o que anseio

Que a morte de tudo em que acredito
Não me tape os ouvidos e a boca
Porque metade de mim é o que eu grito
Mas a outra metade é silêncio.

(...)

Que as palavras que eu falo
Não sejam ouvidas como prece e nem repetidas com
fervor

Apenas respeitadas
Como a única coisa que resta a um homem inundado
de sentimentos

Porque metade de mim é o que ouço
Mas a outra metade é o que calo.

Que essa minha vontade de ir embora
Se transforme na calma e na paz que eu mereço
Que essa tensão que me corrói por dentro
Seja um dia recompensada
Porque metade de mim é o que eu penso mas a outra
metade é um vulcão.

Que o medo da solidão se afaste, e que o convívio
comigo mesmo se torne ao menos suportável.

Que o espelho reflita em meu rosto um doce sorriso
Que eu me lembro ter dado na infância
Por que metade de mim é a lembrança do que fui
A outra metade eu não sei.

Que não seja preciso mais do que uma simples
alegria

Pra me fazer aquietar o espírito
E que o teu silêncio me fale cada vez mais
Porque metade de mim é abrigo
Mas a outra metade é cansaço.

(...)

E que a minha loucura seja perdoada
Porque metade de mim é amor
E a outra metade também.

Agradecimentos

Agradeço à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro concedido para que este trabalho se realizasse.

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e em especial ao Prof. Francisco Maugeri por sua orientação “oficial” nestes anos de Mestrado e Doutorado.

Agradeço ao Prof. Joaquim M. S. Cabral e ao Dr. Pedro. C. B. Fernandes por me receberem tão bem em seu laboratório e por me orientarem num período curto, turbulento mas, muito, muito especial para mim.

Agradeço à banca por todas as suas sugestões e correções, todas foram consideradas com muito esmero.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, desde o mestrado até hoje, por suas orientações “extraoficiais”, cada um de vocês com quem eu convivi no LEB (e também em outros laboratórios) acrescentou algo à minha vida pessoal e profissional. Ao longo dos anos tive que, ainda que contra a minha vontade, ir dando um “até logo!” pra um aqui, pra outro ali... E isso foi muito difícil. Mas a minha hora de dizer “até logo!” também chegou e eu descobri que a prática adquirida ao longo desses anos não ajuda em nada... 😊.

Obrigada a todos os meus amigos, que me deixaram fazer parte de um pedacinho de suas vidas, mas, muito obrigada, especialmente, por terem feito parte da minha. Todas as brincadeiras, todos os desabafos, todos os medos, todas as conquistas, todas as perdas, todas as mudanças... Quanta coisa vivemos juntos..! E apesar de sentir a falta de todos vocês, peço sempre a Deus que os proteja, pois, à cada um seu próprio caminho, ninguém pode fazer isso por nós. Fico feliz em vê-los seguir em frente porque sei que eu também estarei seguindo em frente.

Agradeço a Deus e à minha família por simplesmente existirem. Um dia a gente “sai do ninho” e tem a possibilidade de: exercitar todos os valores que aprendemos nos primeiros anos de vida, cometer erros e aprender com eles e nos confrontarmos como seres humanos num processo longo de autoconhecimento... Ter lembranças tão fortes e vívidas de uma infância tão mágica, tão especial, me impulsiona a cada dia como adulta. Obrigada por, em meio a tantas variáveis, serem minhas constantes. Mas obrigada, principalmente, por serem o ponto de partida da minha vida.

“Foram tantos dias, tantos meses, tantos anos / Foram tantos os enganos, foram tais / As ilusões cruéis, as confusões banais / (...) / Tantos risos de esperança / Que no fundo tanto faz / Se voltarão depois, se ficarão pra trás / Dito assim, parece que o coração esquece / O que merece da lembrança gratidão / Não é isso não, não é isso não (...) Há por exemplo, cenas que ainda contemplo, como um telão / Pra sentir que era assim / Mesmo assim, bem assim / Aquele riacho sempre, sempre indo / Aquele caminho sempre a me levar / Então eu vim parar, parar bem aqui (...)”

Um riacho, um caminho – Gilberto Gil

Zama

Índice

Índice	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Resumo	xvii
Summary	xix

Capítulo 1

Apresentação e Revisão Bibliográfica	01
1- Introdução	03
1.1- Justificativa	04
1.2- Objetivos	05
2- Revisão Bibliográfica	06
2.1- Considerações sobre o mercado de enzimas	06
2.2- Fruto-oligossacarídeos (FOS)	07
2.3- Frutossiltransferase extracelular de <i>Rhodotorula</i> sp.	09
2.4- Aspectos gerais sobre a imobilização de enzimas	10
2.4.a- Adsorção	10
i) Nióbio	11
2.5- Efeitos da imobilização	12
2.5.a- pH	12
2.5.b- Temperatura	13
i) T ₅₀ e ativação térmica	14
ii) Cinética de termodesnaturação	14
2.5.c- Substrato	15
2.5.d- Sais	16
2.6- Planejamento Experimental	16
2.7- Liofilização de proteínas	17
2.7.a- Compostos crio-protetores e formulações de liofilizados	18
3- Referências Bibliográficas	19

Capítulo 2

Characterization of the immobilized fructosyltransferase from <i>Rhodotorula</i> sp.	25
Resumo	27
Abstract	29
1- Introduction	30
1.1- Practical Applications	31
2- Material and Methods	32
2.1- Materials	32
2.2- Microorganism and Enzyme	32
2.3- Inorganic support	33
2.4- Determination of the enzymatic activity and related parameters	33
2.5- Enzyme Immobilization	35

a) Effect of enzyme concentration	35
b) Effect of contact time and the addition of sucrose and CuSO ₄ on enzyme immobilization	35
c) Oriented immobilization	35
2.6- Characterisation of the biocatalyst	35
a) Salt	36
b) pH	36
c) Temperature	36
d) Substrate	36
e) Image analysis	36
2.7- FOS synthesis	37
3- Results and Discussion	37
3.1- Immobilization	37
a) Effect of enzyme concentration	37
b) Effect of contact time and of the addition of sucrose or CuSO ₄	38
c) Oriented immobilization	39
3.2- Characterisation of the biocatalyst	40
a) The effect of salt on thermal stability	40
b) Effect of pH on thermal stability	41
c) Influence of pH on biocatalyst activity	41
d) Influence of temperature on biocatalyst activity	43
e) Influence of substrate concentration on biocatalyst activity	43
f) Image analysis	44
g) Half-life	45
h) FOS synthesis	45
4- Conclusions	46
5- Acknowledgment	47
6- Nomenclature	47
7- References	48

Capítulo 3

Effects of the addition of substrate and salts in the immobilization of the fructosyltransferase and on its catalytic properties	51
Resumo	53
Abstract	55
1- Introdução	56
2- Materiais e Métodos	58
2.1- Sínteses de FOS	58
2.1.a- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de sacarose	59
2.1.b- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de CuSO ₄	59

2.1.c- Sínteses com adição dos sais: CuSO ₄ , MnCl ₂ e NaCl	59
2.2- Identificação e quantificação de carboidratos	59
2.3- Eficiência das sínteses	59
3- Resultados	60
3.1- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de sacarose	61
3.2- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de CuSO ₄	62
3.3- Efeito da adição de sais ao meio de síntese	65
4- Conclusões	67
5- Agradecimentos	68
6- Nomenclatura	68
7- Referências Bibliográficas	68

Capítulo 4

Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. 71

Resumo	73
Abstract	75
1- Introduction	76
2- Material and Methods	77
2.1- Materials	78
2.2- <i>Rhodotorula</i> sp. cultivation and fructosyltransferase partial purification	78
2.3- Inorganic support and enzyme immobilization	78
2.4- The enzymatic activity and related parameters	78
2.5- Effects of temperature	79
2.6- General enzyme thermal stability parameters	80
a) k_d	80
b) E_{ad} and $t_{1/2}$	80
c) T_{50} and thermal activation	80
d) The effect of pre-incubation at 52 and 60°C	81
2.7- Thermodynamic Parameters of Enzyme Denaturation	81
3- Results and Discussion	82
3.1- Calculations of E_{ad} (Arrhenius plot)	82
a) Free Enzyme	82
b) Immobilized Enzyme	82
3.2- Calculation of $t_{1/2}$	84
3.3- Thermodynamic Denaturation Parameters	85
3.4- T_{50} and thermal activation	87
4- Conclusions	89
5- Acknowledgments	90

6- Nomenclature	90
7- References	91

Capítulo 5

Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase 93

Resumo	95
Abstract	97
1- Introduction	98
2- Material and Methods	101
2.1- Material	101
2.2- Enzyme production	102
2.3- Inorganic support and enzyme immobilization	102
2.4- Determination of the enzymatic activity and related parameters	102
2.5- FOS synthesis	103
2.6- Identification and quantification of sugars	103
2.7- Conversion of sucrose and FOS composition	103
2.8- Fractional Factorial Designs for FOS synthesis	104
2.9- Optimization	104
3- Results and Discussion	105
3.1- First (2^{4-1}) Fractional Factorial Design	105
3.2- Second (2^{4-1}) Fractional Factorial Design (FFD)	108
3.3- Selection of significant variables	111
3.4- Optimization of temperature and sucrose concentration	113
5- Discussion	116
6- Acknowledgments	117
7- Nomenclature	117
8- References	118

Capítulo 6

Characterisation of Biocatalysts Immobilized in a New Inorganic Solid Support 121

Resumo	123
Abstract	125
1- Introduction	126
2- Materials and Methods	128
2.1- Enzymes and Materials	128
2.2- Immobilization by adsorption	129
2.3- Characterization of the free and immobilized enzymes	129
3- Results	130
3.1- Characterisation of the biocatalysts	130
3.1.a- Inulinase from <i>A. niger</i>	130

3.1.b- Invertase from baker's yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	132
3.2- Hydrolysis of inulin	134
3.3- Hydrolysis of sucrose and transfructosylation activity	136
4- Conclusion	139
5- Acknowledgment	141
6- Nomenclature	141
7- References	142

Capítulo 7

Effects of Lyophilization in the Catalytic Properties of the Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10

Resumo	147
Abstract	149
1- Introdução	150
1.1- Liofilização	151
2- Materiais e Métodos	154
2.1- Seleção dos aditivos	154
2.2- Preparo das amostras e etapas de análises	154
2.3- Liofilização da frutossiltransferase	155
2.4- Caracterização dos liofilizados	155
a) Atividade Residual Liofilizada	156
b) Atividade Residual Térmica Liofilizada	156
c) Atividade Enzimática Específica Liofilizada	156
d) Conversão da Sacarose em FOS	157
e) Produtividade específica de FOS	157
f) Atividade de água (Aw)	157
g) Redução do peso e da atividade enzimática após a liofilização	157
3- Resultados e Discussão	158
3.1- Estudo dos efeitos individuais de aditivos na liofilização da frutossiltransferase	160
3.2- Avaliação dos liofilizados simples após 6 meses de estoque a -20°C	163
3.3- Estudo de formulações para liofilização da frutossiltransferase	166
3.4- Avaliação dos formulados liofilizados após 6 meses de estoque a -20°C	170
3.5- Avaliação sobre o efeito da pré-ativação em 52 e 60°C antes da liofilização	172
3.6- Efeito da liofilização sobre a síntese otimizada de FOS	173
4- Conclusões	175
5- Agradecimentos	176

6- Nomenclatura	176
7- Referências Bibliográficas	176

Capítulo 8

Effects of Lyophilization in the Catalytic Properties of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10

Resumo	181
Abstract	183
1- Introdução	184
2- Materiais e Métodos	187
2.1- Seleção dos aditivos	187
2.2- Preparo das amostras e etapas de análises	187
2.3- Liofilização da frutossiltransferase immobilizada em nióbio	188
2.4- Caracterização dos liofilizados	188
a) Atividade Residual Liofilizada	189
b) Atividade Residual Térmica Liofilizada	189
c) Atividade Enzimática Específica Liofilizada	189
d) Conversão da Sacarose em FOS	189
e) Produtividade específica de FOS	190
f) Atividade de água	190
3- Resultados e Discussão	190
3.1- Estudo dos efeitos individuais dos aditivos	191
3.1.a- Avaliação dos liofilizados simples após 6 meses de estoque a -20°C	193
3.2- Estudo de formulações para liofilização	195
3.2.a- Análise dos imobilizados liofilizados formulados após 6 meses de estocagem refrigerada (-20°C)	198
3.3- Avaliação sobre o efeito da pré-incubação a 52 e 60°C antes da liofilização	199
3.4- Efeito da liofilização da frutossiltransferase sobre a síntese otimizada de FOS	200
4- Conclusões	202
5- Agradecimentos	203
6- Nomenclatura	203
7- Referências Bibliográficas	203

Capítulo 9

Conclusões	207
Sugestões para trabalhos futuros	209

Lista de Figuras

Capítulo 2

- Figure 1:** Effect of enzyme activity on the immobilization onto a niobium support. The dashed line indicates an ideal situation where $\epsilon_{\text{immob}}=1.0$ _____ **38**
- Figure 2:** Yields of immobilized FTase during incubation in 50 mM acetate buffer, pH 4.5 under the conditions: standard [dark circle], with 4% (w/v) sucrose [white triangle], with 8% (w/v) sucrose [grey triangle], with 5 mM CuSO₄ [white square] and with 10 mM CuSO₄ [grey square]. Bars indicate the standard deviation _____ **39**
- Figure 3:** Effects of pH on immobilized FTase: transfructosylation activity, U_i (continuous line) and the ratio with hydrolytic activity, U_i/U_{iH} (dotted line) _____ **42**
- Figure 4:** Influence of the temperature at pH 4.5 and 6.0 on the immobilized FTase: biocatalyst U_i (continuous line) and the ratio with hydrolytic activity, U_i/U_{iH} (dotted line) _____ **44**
- Figure 5:** Influence of sucrose concentration on the biocatalyst activity at pH 4.5 and 6.0 _____ **44**
- Figure 6:** Microphotographs ($\times 5,000$) by SEI showing the particle surface **a**) before (clean particles; superficial porosity) and **b**) after enzyme immobilization (solution of precipitated proteins with transfructosylation activity adsorbed) _____ **45**

Capítulo 3

- Figure 1:** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas fechados) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio em presença de 4 and 8% (p/v) de sacarose (triângulos e quadrados, respectivamente) e imobilizada de forma padrão (círculos). As sínteses foram realizadas as condições de: 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: **a**) 4,5 e **b**) 6,0 _____ **61**
- Figura 2:** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas fechados) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio em presença de 2, 5 and 10 mM of CuSO₄ (pentágonos, quadrados e triângulos, respectivamente) e imobilizada de forma padrão (círculos). As sínteses foram realizadas sob condições simples: 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: **a**) 4.5 and **b**) 6.0. _____ **63**
- Figure 3:** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas cheios) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio. As sínteses foram realizadas a: 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: **a**) 4,5 e **b**) 6,0. Foram analisados os efeitos da adição individual de 10 mM de CuSO₄ (triângulos), MnCl₂ (quadrados) e NaCl (pentágonos) _____ **66**

Capítulo 4

- Figure 1:** Calculation of E_{ad} for the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the forms: free (pH 4.5) – white circles [linear fit: $y = 35.404.x - 99.936$; $R^2=0.992$]; immobilized (pH 4.5) phase 1 – black squares [linear fit: $y = 35.331.x - 100.56$; $R^2=0.995$] and phase 2 – gray squares [linear fit: $y = 21.181.x - 54.807$; $R^2=0.976$]; immobilized (pH 6.0) phase 1 – black triangles [linear fit: $y = 38.422.x - 86.582$; $R^2=0.996$] and phase 2 – gray triangles [linear fit: $y = 31.653.x - 86.582$; $R^2=0.952$] _____ **83**
- Figure 2:** Experimental data (symbols) and estimate according to the model (lines) for the half-life ($t_{1/2}$) of the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free form at pH 4.5 (represented by squares and uninterrupted lines) and immobilized at: pH 4.5 (represented by circles and dotted lines) and pH 6.0 (represented by triangles and dotted lines) _____ **85**
- Figure 3:** Thermodynamic parameters for the denaturation of the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free (black circles) and immobilized at pH 4.5 (dark grey triangles) and at pH 6.0 (light grey triangles): **a**) Gibbs free energy (ΔG); **b**) Enthalpy (ΔH); **c**) Entropy (ΔS) _____ **86**

Figure 4: Thermal activation profile after 15 min of incubation at different temperatures and the estimation of half-inactivation temperature (T_{50}) for the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free form (white circles and dotted line) and immobilized form at pH 4.5 (grey squares and full line) and at pH 6.0 (black triangles and dashed line). The light dotted line parallel ($R_T^{15} = 1.0$) is a reference for the standard condition, without previous incubation; the dashed line parallel ($R_T^{15} = 0.50$) indicates T_{50} 88

Capítulo 5

Figure 1: Chemical structures of the most common fructooligosaccharides (FOS): 1-kestose (GF₂; MW = 504.44; C₁₈H₃₂O₁₆), nystose (GF₃; MW = 666.58; C₂₄H₄₂O₂₁) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄; MW = 828.72; C₃₀H₅₂O₂₆) 98

Figure 2: Yield of FOS (Y_{FOS}) at different temperatures: 46°C (white square); 48°C (black triangle); 50°C (grey circle) and 52°C (black star); the synthesis were carried out at pH 6.0, 20 U_i/mL and with: **a)** 50% and **b)** 55% (w/v) of initial sucrose concentration. Standard errors values ranged from 0.003 to 0.012 113

Figure 3: Time courses of FOS synthesis for: **a)** residual composition of: sucrose (ϕ_{GF}) – black circle, glucose (ϕ_G) – gray circle, and fructose (ϕ_F) – white circle, and FOS yield (Y_{FOS}) – black triangle; and **b)** FOS composition: 1-kestose (ϕ_{GF_2}) – black triangle, nystose (ϕ_{GF_3}) – gray triangle, and 1F-fructofuranosyl-nystose (ϕ_{GF_4}) – white triangle. The syntheses were carried out with 50% (w/v) of initial sucrose concentration at 48°C, 20 U_i/mL and pH 6.0. Standard errors values ranged from 0.003 to 0.013 115

Capítulo 6

Figure 1: Effect of **a)** sucrose concentration ($U^{[GF]}/U^{500g/L}$), **b)** pH ($U^{pH}/U^{pH4.5}$) and **c)** temperature ($U^T/U^{60^\circ C}$) on inulinase from *A. niger*: free (filled symbols and lines) and immobilized (open symbols and dotted lines), in sodium acetate buffer 100 mM 131

Figure 2: Effect of **a)** sucrose concentration ($U^{[GF]}/U^{500g/l}$), **b)** pH ($U^{pH}/U^{pH4.5}$) and **c)** temperature ($U^T/U^{60^\circ C}$) on invertase from *S. cerevisiae*: free (filled symbols and lines) and immobilized (open symbols and dotted lines), in sodium acetate buffer 100 mM 133

Capítulo 7

Figura 1: Liofilizados simples da frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 obtidos de soluções enzimáticas: **a)** não diluída ($A_w = 0,187 \pm 0,001$; maior resistência a quebra da torta liofilizada e a dissolução) e diluída em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 em **b)** 1:2 v/v ($A_w = 0,192 \pm 0,004$; pó uniforme; fácil dissolução) e **c)** 1:6 v/v ($A_w = 0,276 \pm 0,001$; coloração mais clara; pó muito fino e uniforme; fácil dissolução) 159

Figure 2: **a)** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e **b)** composições percentuais dos FOS provenientes de sínteses conduzidas com o liofilizado padrão sem aditivos da frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10: sem diluição (s.d) (quadrados e linhas cheias) e diluído (triângulos invertidos e linhas tracejadas) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 em 1:6 (v/v); os liofilizados foram estocados a -20°C por 6 meses e sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5, 50°C, 10 U_{TF}^{Liof}/mL 165

Figura 3: **a)** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e **b)** composições percentuais dos FOS obtidos em sínteses realizadas com os liofilizados sem aditivos da frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10: diluída em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 em 1:2 v/v (quadrados e linhas cheias) e 1:6 v/v (triângulos invertidos e linhas tracejadas); os liofilizados foram estocados a -20°C por 6 meses e sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5, 50°C e 10 U_{TF}^{Liof}/mL 171

Figure 4: **a)** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e **b)** composição percentual dos FOS obtidos com a frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 como solução não liofilizada (quadrados e linhas cheias) e

liofilizada com diluição de 1:2 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 (triângulos invertidos e linhas tracejadas). As sínteses foram realizadas sob condições otimizadas determinadas previamente: 48°C, 10 U_{TF}/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0 _____ **173**

Capítulo 8

Figura 1: **a)** Partículas limpas de nióbio ($A_w = 0,442 \pm 0,001$) com tamanho de partícula selecionado entre 65-80 Mesh (212-180 μm); **b)** Liofilizados simples da frutossiltransferase parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 ($A_w = 0,230 \pm 0,001$) _____ **191**

Figure 2: **a)** Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e **b)** composição percentual dos FOS obtidos com a frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 nas formas não liofilizadas (quadrados e linhas cheias) e liofilizada (triângulos invertidos e linhas tracejadas) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5. As sínteses foram realizadas sob condições otimizadas: 48°C, 20 U_i/mL, 50% (p/v) de sucrose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0 _____ **201**

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Table 1: Effect on immobilization efficiency (ϵ_{immob} - Eq.7) and residual activity (R_{65}^{35} - Eq.8) for standard random immobilization methodology (2 steps) and oriented (3 steps) in a medium containing glutaraldehyde at 2.5% (v/v), with and without 4% (w/v) of sucrose _____ **40**

Table 2: Data for the yields from sucrose (Y_{FOS} - Eq.10) and FOS composition ($\phi_{\text{GF}_{n=2-4}}$ - Eq.11), with immobilized FTase at 7 and 14 U_i/mL and at pH values of 4.5 and 6.0 _____ **46**

Capítulo 3

Tabela 1: Composição percentual dos FOS: 1-kestose (GF_2), nistose (GF_3) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF_4) obtidos de sínteses com frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio com 0 (padrão), 2, 5 e 10 mM de CuSO₄ adicionado ao meio de dispersão da imobilização. As sínteses foram realizadas em 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50mM em pH 4,5 e 6,0. Os desvios padrão variaram entre 7 e 3% dos valores _____ **64**

Tabela 2: Composição percentual dos FOS: 1-kestose (GF_2), nistose (GF_3) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF_4) obtidos de sínteses com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 imobilizada em nióbio. As sínteses foram realizadas sob condições simples: 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5 e 6,0 adicionadas isoladamente de 10 mM de MnCl₂ e NaCl e sem aditivos (padrão). Os desvios padrão variaram entre 7 e 3% dos valores _____ **67**

Capítulo 4

Table 1: The effect of pre-incubation at 52 or 60 °C on the thermal stability of free (pH 4.5) and immobilized (pH 4.5 and 6.0) partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. expressed as a function of the residual activity (Eq. 4) with (R_{7-65}^{15-35}) and without (R_{65}^{35}) the pre-incubation step _____ **89**

Capítulo 5

Table 1: Data of the first (2^{4-1}) Fractional Factorial Design with real and coded (in brackets) values for four variables (factors) and four response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕ_{GF_n} , $n = 2, 3$ or 4), during synthesis time _____ **106**

Table 2: Statistical analysis of the first (2^{4-1}) Fractional Factorial Design: effects estimates for the 4 response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕ_{GF_n} , $n = 2, 3$ or 4) and the curvature (central points) considering 4 factors: temperature (°C), pH, initial sucrose concentration [GF^0] and immobilized enzyme concentration [E] _____ **107**

- Table 3:** Data for the second (2^{4-1}) Factorial Fractional Design with real and coded (in brackets) values for four variables (factors) and four response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4), during synthesis time **109**
- Table 4:** Statistical analysis of the second (2^{4-1}) Fractional Factorial Design: effects estimates for the 4 response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4) and the curvature (central points) considering 4 factors: temperature ($^{\circ}C$), pH, initial sucrose concentration [GF^0] and immobilized enzyme concentration [E] **110**
- Table 5:** Comparison between non optimized and optimized FOS production processes with immobilized and partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 **115**

Capítulo 6

- Table 1:** Percent compositions of glucose (%G), fructose (%F) and FOS { GF_3+GF_4 } (%FOS) and specific productivities of reducing sugars ($\mu g_{(G+F)}/U.h$) with inulinase from *A. niger* and invertase from *S. cerevisiae*, free and immobilized on niobium with two different inulins as substrate: from *Dhalia* tubers, with a degree of polymerization (n) of $20 < n < 25$, and from chicory with $n = 10$ **135**
- Table 2:** Percent composition of glucose (%G), fructose (%F) and FOS { $GF_2+GF_3+GF_4$ } (%FOS) and specific productivities of reducing sugars ($\mu g_{(G+F)}/U.h$) and FOS ($\mu g_{FOS}/U.h$) with free and immobilized inulinase from *A. niger*, invertase from *S. cerevisiae* and fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, with sucrose as substrate **138**

Capítulo 7

- Table 1:** Caracterização da frutossiltransferase (parcialmente purificada) (Ftase) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em presença e ausência de aditivos estabilizantes. Os parâmetros de caracterização foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática térmica residual [$R^{Liof 65^{\circ}C}$], atividade enzimática específica liofilizada [$^*U_{pm}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS após 24 h [Y_{FOS}] e produtividade específica de FOS após 24 h [Pr_{FOS} ($mg/U.h$)]. Sínteses realizada com 0.02 g de liofilizado em 5 mL de 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 **161**
- Table 2:** Análise da atividade residual liofilizada (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estocagem, em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Table 1) com a frutossiltransferase parcialmente purificada e liofilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. A atividade enzimática liofilizada dos padrões sem aditivos após 6 meses foi de $507,72 U_{TF}^{Liof} / g$ para as duas condições: com e sem diluição **164**
- Tabela 3:** Caracterização de liofilizados formulados da frutossiltransferase parcialmente purificada (FTase), onde os parâmetros de caracterização, para 1 g de solução e de liofilizado, foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática residual térmica liofilizada [$R^{Liof 65^{\circ}C}$], atividade enzimática específica liofilizada [$^*U_{pm}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS após 72 h [Y_{FOS}] e produtividade específica de FOS após 72 h de síntese [Pr_{FOS} ; $mg/U.h$]. As análises foram feitas em duplicatas. Sínteses realizadas com 0,02 g de liofilizado em 5 mL de 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 **167**
- Tabela 4:** Análise da atividade residual liofilizada (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estocagem em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 4) com a frutossiltransferase (parcialmente purificada) e liofilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 em formulações. A atividade enzimática liofilizada dos padrões após 6 meses foi de $757,14 \pm 31,18 U_{TF}^{Liof} / g$ (diluição 1:2) e $431,03 \pm 44,36 U_{TF}^{Liof} / g$ (diluição 1:6). A concentração de cada aditivo foi de 1,25% (p/v) para cada formulação **170**

Capítulo 8

- Table 1:** Caracterização da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em presença e ausência de aditivos estabilizantes. Os

- parâmetros de caracterização considerando 1 g de liofilizado foram: atividade enzimática imobilizada residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática imobilizada residual térmica liofilizada ($R^{Liof,65^\circ C}$), atividade enzimática imobilizada específica liofilizada [${}^*U_{pin}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS após 24 h [Y_{FOS}] e produtividade após 24 h [Pr_{FOS} ; mg/U.h] _____ **192**
- Tabela 2:** Análise da atividade residual liofilizada de estocagem (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estoque em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 1) da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. A condição liofilizada padrão simples apresentou atividade enzimática após 6 meses de estoque de 15,61 U_i^{Liof} / g _____ **194**
- Tabela 3:** Sínteses realizadas com os liofilizados obtidos em tampão acetato de sódio: 50 e 200 mM (pH 4,5) sem aditivos com a frutossiltransferase parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. Os liofilizados foram estocados a $-20^\circ C$ por 6 meses sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, $50^\circ C$ e 6,31 U_i/mL . Avaliou-se a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), a produtividade específica de FOS (Pr_{FOS} ; mg/ U_i .h) e a composição percentual de cada FOS obtido: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄) _____ **195**
- Tabela 4:** Caracterização de liofilizados formulados da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. Os parâmetros de caracterização para 1 g de liofilizado, foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática residual térmica [$R^{Liof,65^\circ C}$], atividade enzimática liofilizada específica [${}^*U_{pin}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS [Y_{FOS}] e produtividade após 72 h de sínteses [Pr_{FOS} ; mg/ U_i .h] _____ **197**
- Tabela 5:** Análise da atividade residual liofilizada de estocagem (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estoque a $-20^\circ C$ em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 4) da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em formulações. A condição imobilizada liofilizada padrão (sem aditivos) apresentou após 6 meses uma atividade enzimática de: $35,87 \pm 0,98 U_i^{Liof} / g$. O diluente utilizado para obtenção dos liofilizados foi tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 _____ **199**

Resumo

A obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS), um açúcar prebiótico de vasta aplicação industrial, por enzimas imobilizadas abrange dois conceitos em grande expansão: aplicação industrial de enzimas imobilizadas e alimentos funcionais. A partir de flores da Mata Atlântica Brasileira uma cepa foi isolada e identificada como *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e apresentou grande potencial para produção da enzima extracelular frutossiltransferase (FTase) - capaz de produzir FOS a partir da sacarose - sendo obtida apenas por precipitação com etanol (purificação parcial) direto do meio de cultivo livre de células, de acordo com estudos realizados previamente, a cinética entre a enzima imobilizada pura e a parcialmente purificada não apresentou diferenças significativas que justificassem etapas adicionais de purificação. Estudos anteriores selecionaram a adsorção em partículas do composto sólido-ácido (Nb), uma liga formada por nióbio (~95%) e grafite (~5%) como metodologia sugerida para imobilização da FTase para produção de FOS. Dessa forma, este trabalho apresenta uma série de estudos de caracterização deste biocatalisador imobilizado. Após a imobilização, foi possível observar que além do pH de máxima atividade apresentado pela enzima livre (pH 4,5) um segundo ponto distinto de máxima atividade (25% menor que em pH 4,5) também foi observado, o pH 6,0 que demonstrou também ser uma condição de maior estabilidade térmica e também melhor condição de síntese com a enzima imobilizada. O estudo da termo-estabilidade revelou também que a imobilização induziu a formação de duas zonas de energias de ativação da desnaturação (E_{ad}) diferenciadas: entre 47 e 51°C a enzima imobilizada é mais estável que a enzima livre e entre 52 e 70°C ela é menos estável. A incubação da FTase, imobilizada e livre, em 52°C por 15 min resultou numa ativação dos biocatalisadores, sendo mais pronunciada com a enzima imobilizada e em pH 4,5 apresentando um aumento de 1,8 vezes na atividade enzimática; no entanto, observou-se que esta ativação é momentânea e não acumulativa com outras metodologias como a liofilização; isto sugere que esta temperatura representa algum tipo de limite energético para a FTase que é um hetero-dímero e pode apresentar diversas interações com o nióbio. A otimização da síntese de FOS realizada pela aplicação da metodologia de planejamento experimental com a enzima imobilizada permitiu um aumento do rendimento ($Y_{FOS} = 0,58$) em 5%, uma redução no tempo de síntese (24 h) em 4 vezes e um aumento da produtividade (12,05 g/L.h) em 6 vezes. A adsorção da FTase ao nióbio demonstrou não utilizar os sítios ativos uma vez que, a adição da sacarose ao meio de dispersão para adsorção, não alterou o desempenho do biocatalisador, porém a adição de $CuSO_4$ que é um forte estabilizador térmico para esta enzima, resultou num biocatalisador incapaz de produzir FOS. Tendo em vista a aplicação industrial da FTase, avaliou-se também os efeitos da liofilização sobre a enzima livre e imobilizada. Com a enzima livre a liofilização causou perda de atividade enzimática em função da densidade da solução de partida, mas, resultou num pó com até 6 vezes mais atividade por grama do que em relação à enzima livre não liofilizada; a adição individual de compostos crio-protetores apresentou maior efeito estabilizador do que em formulações. Com a enzima imobilizada, a liofilização não apresentou grandes diferenciações, observou-se de forma geral uma manutenção das características originais do imobilizado de partida. Todavia, uma importante diferenciação proveniente da liofilização foi observada tanto para a enzima livre quanto imobilizada: a

cinética de produção de FOS, o rendimento foi aumentado em diferentes proporções mas, especialmente, foi observada uma elevada composição de GF₄. Estudos mais específicos sobre a estrutura tridimensional forneceriam informações mais precisas sobre o efeito da liofilização. Adicionalmente, duas enzimas comerciais (inulinase e invertase) foram igualmente imobilizadas em nióbio, mas, não foram observadas alterações tão expressivas quanto às observadas com a FTase. Dessa forma, a imobilização da FTase em nióbio revela ser uma metodologia com grande potencial de aplicação em reatores. Como resultado deste trabalho, encontram-se publicados até o momento os Capítulos 2 e 4 e aceito para publicação o Capítulo 5.

Palavras-chave: Arrhenius, Delineamento Fatorial Fracionado, Fruto-oligossacarídeos, Liofilização, Nióbio.

Summary

The production of fructooligosaccharides (FOS) - a prebiotic sugar with wide industrial application - from immobilized enzymes includes two modern concepts: industrial application of immobilized enzymes and functional food. A strain isolated from flowers from the Brazilian Atlantic Forest identified as *Rhodotorula* sp. LEB-V10 showed great potential for production of the extracellular fructosyltransferase (FTase), which is capable of producing FOS from sucrose. It can be recovered only by precipitation with ethanol (partial purification), directly from the cell-free culture medium. According to previous studies, the kinetics between purified and partially purified immobilized enzymes showed no significant differences that could justify additional purification steps. Other previous studies have selected the adsorption on particles of a solid-acid support (Nb) an alloy consisting of niobium (~95%) and graphite (~5%) as suggested methodology for the immobilization of FTase for FOS production. Thus, this work presents a series of characterization studies of this immobilized biocatalyst. After the immobilization, it was observed that besides the pH of maximum activity presented by the free enzyme (pH 4.5), a second distinct point of maximum activity (25% lower than at pH 4.5) was also observed, pH 6.0, which was proved to be the best condition for thermal stability and also better for synthesis with the immobilized enzyme than pH 4.5. The study of thermal stability has also shown that immobilization induces the formation of two distinct phases with different denaturation activation energy (E_{ad}): between 47 and 51°C, the immobilized enzyme is more stable than the free enzyme, and between 52 and 70°C it is less stable. Incubation of free and immobilized FTase at 52°C for 15 min resulted in enzymatic activation, being more pronounced with the immobilized enzyme at pH 4.5 with a 1.8-fold increase in enzyme activity. However, due to other studies carried out in this work, it has been shown that this activation is merely transient and not cumulative regarding other methodologies, indicating that this temperature is a kind of energetic threshold, and also because FTase is a hetero-dimer, which may lead to different interactions with the niobium support. The optimization of the synthesis of FOS carried out by applying the methodology of experimental design with the immobilized enzyme, allowing a yield increase ($Y_{FOS} = 0.58$) of 5%, a reduction in synthesis time (24 h) of 4 times and an increased productivity (12.05 g/L.h) of 6 times. The adsorption on niobium has shown not to involve the FTase active sites, since the addition of sucrose to the dispersion medium for adsorption did not affect the performance of the biocatalyst. On the other hand, the addition of $CuSO_4$, which is a strong thermal stabilizing agent for this enzyme, resulted in a biocatalyst incapable of producing FOS. Considering the industrial application of FTase, it was also evaluated the effects of lyophilization over the free and immobilized enzyme. With the free enzyme, lyophilization caused loss of enzyme activity in dependence on the density of the starting solution, but in general, resulted in a powder with up to 6 times more activity per gram as compared to non-lyophilized free enzyme; the individual effects of cryo-protectants additives presented higher stabilizing effect than with the presence of other protectants. The lyophilization of the immobilized enzyme did not show drastic effects and it was observed, in general, the maintenance of the initial properties and characteristics before lyophilization. For both, free and immobilized enzyme was possible to observe significant

changes in the kinetics of FOS production, the yield was increased in different proportions but, especially, there was a high composition of GF₄, which was not observed before lyophilization. In addition, two commercial enzymes (inulinase and invertase) were immobilized on niobium but no significant changes were observed as those with FTase. Thus, the immobilization of FTase in niobium proves to have a big potential for application due to operational features. As a result of this work, two articles have been published (Chapters 2 and 4) and one has been accepted for publication (Chapter 5).

Keywords: Arrhenius Plot, Fractional Factorial Design, Fructooligosaccharides, Lyophilization, Niobium.

Apresentação e Revisão Bibliográfica

1- Introdução

Biotecnologia pode ser classificada até o momento de acordo com as seguintes ramificações: *red biotechnology* (aplicação médica), *green biotechnology* (aplicação agrícola), *white biotechnology* (aplicação industrial), *blue biotechnology* (aplicação marinha e aquática) e bioinformática (ou biologia computacional) (Bernard *et al.*, 2001; Queffelec *et al.*, 2009; Tang & Zhao, 2009). A biotecnologia industrial (*white*) tem se desenvolvido nas últimas décadas por motivos diversos, mas mais especificamente devido à preocupação mundial com o esgotamento de fontes naturais e a busca por processos e fontes alternativas e renováveis para obtenção industrial de produtos químicos e fármacos, alimentos e combustíveis. De acordo com Tang e Zhao (2009) a força que move esse grande desenvolvimento da biotecnologia industrial é a economia de mercado, uma vez que a biotecnologia pode oferecer processos altamente eficientes e de excelente retorno de investimento. Estes mesmos autores indicam os EUA, União Européia, China, Índia e Brasil como grandes contribuintes (desenvolvendo ou investindo) e consumidores dos benefícios da biotecnologia industrial.

As enzimas têm sido alvo de amplos estudos nas últimas décadas e em muitos casos, sua aplicação industrial como biocatalisadores, tem sido bem sucedida devido a uma série de fatores como especificidade, seletividade e altas velocidades de reação. Embora o custo das enzimas em escala laboratorial seja, em muitos casos, elevado, em larga escala os custos tendem a reduzir drasticamente com o aumento da produção. Uma planta de produção necessária para um processo contínuo, além de poder ser construída separadamente à área industrial, chega a ser duas vezes menor que a requerida para um processo em batelada. O emprego de uma enzima na forma imobilizada apresenta muitas vantagens em comparação com sua forma livre como: uso repetido e operação contínua do sistema, facilidade de separação (devido à insolubilização) entre produtos finais e enzima imobilizada, possível manipulação e controle das propriedades enzimáticas como sua estabilidade, dentre outras vantagens (van-Belien & Li, 2002; Chaplin & Bucke, 1990; Goldberg, 1994; Shuler & Kargi, 1992).

1.1- Justificativas

Devido à conscientização de consumidores, a busca por alimentos saudáveis tem sido crescente e nessa classe de alimentos pode-se citar os prebióticos, como alimentos funcionais. Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados prebióticos por estimularem o crescimento de uma microflora benéfica em nosso intestino, os probióticos. Em países da Europa e no Japão, seu consumo é bastante disseminado. No entanto, no Brasil, a disponibilidade desses oligossacarídeos é muito limitada, uma vez que na grande maioria dos casos eles são importados e por essa razão são inacessíveis a uma grande parcela da população.

Desde 2002, os FOS e microrganismos com alto potencial de transfrutossilacção têm sido alvo de pesquisas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA-FEA/UNICAMP), tendo como resultado atual as seguintes patentes: PI 0202602-3 (Maugeri & Pinheiro, 2002), PI 0404152-6 (Maugeri *et al.*, 2004) e PI 0705359-2 (Maugeri *et al.*, 2007); e a patente PI 0706083-1 referente ao processo de imobilização em liga de nióbio (95%) e grafite (5%) (Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2007).

Como referência, podemos citar ainda algumas patentes como: US Patent 20020182682 (Park & Pastore, 2002) de um dos laboratórios da FEA-UNICAMP, para imobilização de FTase de origem fúngica em meio semi-sólido composto por farelo de trigo para produção de FOS; US Patent 5.334.516 (Muramatsu *et al.*, 1994) relativo à produção de FOS de estruturas ramificadas como os obtidos naturalmente de frutos e folhas; US Patent 5.314.810 (Kono *et al.*, 1994) sobre aplicação de uma FTase fúngica imobilizada em suporte granular do tipo quitosana para aplicação em reatores do tipo coluna e batelada agitada e ainda, dentre tantas outras, a patente US2005/0069627A1 (Mysore *et al.*, 2005) para preparo de uma mistura de FOS com adição de adoçante complementar.

Desde a identificação do ótimo potencial de transfrutossilacção pela enzima frutossiltransferase (FTase) extracelular de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 isolada de flores da Zona da Mata Atlântica brasileira por Hernalsteens (Hernalsteens, 2006; Maugeri & Hernalsteens, 2007), estabeleceu-se o projeto principal intitulado “Estudo da síntese de oligossacarídeos pela enzima frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp.” financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e dentro deste projeto vários outros foram

conduzidos em sequência: purificação de FOS (Kuhn & Maugeri, 2010 (a) e (b); Kuhn, 2010 e 2006), estudo da cinética enzimática (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho 2010 e 2011; Alvarado-Huallanco, 2010), cultivo do microorganismo e produção da enzima (Barbosa, 2007) e, mais especificamente, estudos iniciais sobre a imobilização enzimática (Aguiar-Oliveira, 2007) financiados pela CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) além dos projetos de: Doutorado intitulado “Modelagem, Simulação e Operação de Biorreatores com Frutosiltransferase de *Rhodotorula* sp. Imobilizada em Suporte Inorgânico” (Aguiar-Oliveira, 2011) financiado pela FAPESP e do projeto de Doutorado “Sandwich” intitulado “Caracterização e estudo da estabilidade térmica das enzimas: invertase de *Saccharomyces cerevisiae* e inulinase de *Aspergillus niger* imobilizadas em suporte inorgânico” (Aguiar-Oliveira, 2010) financiado pela CAPES dos quais resultaram o presente trabalho. Todos estes estudos têm sido motivados pela diversidade de aplicação dos FOS em indústrias de alimentos devido a sua funcionalidade (Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2008).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* sp., até o momento, não são diretamente associadas à produção de FOS e praticamente só há referência às enzimas de fungos e algumas bactérias. Neste trabalho, apresentamos a *Rhodotorula* sp. LEB-V10 como uma fonte alternativa de enzima com atividade de transfrutossilação, além de o seu cultivo ser realizado em meio industrial tratado composto por água de maceração de milho e melaço de cana que são considerados resíduos da indústria açucareira (Yun, 1996).

Muitas técnicas, já consolidadas de imobilização enzimática para produção de FOS vêm sendo empregadas em diversos países com ótimos resultados. A investigação detalhada de técnicas de imobilização com grande potencial de aplicação é necessária e de grande importância para um possível escalonamento industrial. Estudos anteriores (Aguiar-Oliveira, 2007) comprovaram a necessidade de continuidade desta linha de pesquisa visando uma melhor compreensão sobre o comportamento enzimático após imobilização.

1.2- Objetivos

Neste trabalho, tendo como fonte produtora da enzima frutosiltransferase um microorganismo isolado, selecionado e identificado como pertencente ao gênero *Rhodotorula* no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de

Engenharia de Alimentos (FEA-UNICAMP), com características comprovadamente promissoras de produção de fruto-oligossacarídeos, visou-se a continuação dos estudos iniciados em um Mestrado (Aguiar-Oliveira, 2007) - cujos resultados foram empregados como referência – buscando uma aplicação futura dessa enzima na forma imobilizada em biorreatores tendo como produtos finais os referidos oligossacarídeos.

Portanto, os objetivos deste trabalho são:

- a) realizar estudos complementares sobre estabilidade térmica da enzima:
 - obter o k_d em diferentes temperaturas para complementar dados anteriores,
 - analisar a ativação térmica e T_{50} ,
- b) estudar a adsorção enzimática quanto:
 - perfil de adsorção,
 - efeito da sacarose e do sal CuSO_4 ,
- c) estudar a síntese de oligossacarídeos envolvendo:
 - efeito da adsorção em presença de sacarose e CuSO_4 sobre a capacidade catalítica do biocatalisador FTase/Nb,
 - efeito da adição de sais ao meio de síntese,
 - otimização das condições de síntese por metodologia de planejamento experimental;
- d) estudar a liofilização da FTase livre e imobilizada;
- e) estudar comparativamente o efeito da adsorção do nióbio sobre:
 - inulinase de *Aspergillus niger* e invertase de *Saccharomyces cerevisiae*,
- f) caracterizar o biocatalisador FTase/Nb em relação à:
 - propriedades estruturais,
 - porosidade do leito, partícula e total,
 - análises de imagem.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Considerações sobre o mercado de enzimas

Conforme citação de Bon *et al.* (2008), a maior parte das enzimas comercializadas industrialmente é extracelular e a etapa de separação das células do meio de cultura (isolamento/purificação) é fundamental para o custo final do processo biotecnológico como

um todo. Preparações enzimáticas parcialmente purificadas são suficientes para diversas aplicações industriais (exceto para fins medicinais, por exemplo) não sendo necessário o investimento e desenvolvimento de diversas etapas de purificação. O importante é, ainda segundo estes autores, que as preparações enzimáticas obtidas mantenham suas características de biocatalisador durante o armazenamento e comercialização até sua utilização, uma vez que as enzimas são comercializadas com base em sua atividade biocatalítica. Existem ainda casos em que a própria indústria produz a enzima que necessita, caso a metodologia não seja muito complexa ou de custo elevado.

Os direitos e propriedades sobre enzimas e processo biotecnológicos baseados em reações enzimáticas tem muita importância para a evolução e desenvolvimento de tecnologias, atuando nesta área principalmente o Estado, os meios acadêmicos e o setor privado que é o que mais investe neste mercado. A aplicação de enzimas imobilizadas ao invés das enzimas livres abre possibilidades diversas de usos (até como eletrodos) e campos de atuação (uso prolongado em processos industriais para fármacos, compostos químicos, alimentos, etc.). O valor de venda de enzimas para uso em indústrias de alimentos, detergentes e químicos totalizavam em 1992 aproximadamente US\$ 700 milhões e em 2004 a indústria mundial de enzimas obteve um faturamento de US\$ 3,7 bilhões. De acordo com projeções, o mercado tende a crescer em torno de 6,5 % ao ano, acompanhado da redução de preços devido ao aumento de empresas envolvidas na comercialização de enzimas, livres ou imobilizadas até 2009, e para 2014 a demanda mundial de enzimas industriais é estimada em torno de US\$ 4 bilhões (Sá-Pereira *et al.* em: BON *et al.*, 2008).

2.2- Fruto-oligossacarídeos (FOS)

FOS são oligossacarídeos (GF_n) compostos por “n” grupos frutose ligados em cadeia na posição β -2,1 possuindo uma glicose terminal e foram classificados por Gibson e Roberfroid (1995) como prebióticos (alimento funcional) devido à sua ação seletiva de promover o desenvolvimento de uma microflora benéfica ao organismo localizada em nosso intestino, os probióticos (Gibson *et al.* 2004; Goldberg, 1994; Passos & Park, 2003). Os FOS mais conhecidos são: GF_2 (1-kestose), GF_3 (nistose) e GF_4 (1^F-frutofuranosil-nistose). Dentre eles, ainda não se sabe ao certo qual seria a composição ideal de cada um, mas Stewart *et al.* (2008) declaram, por exemplo, que quanto maior a cadeia destes

oligossacarídeos não digeríveis, mais demorada será sua fermentação por bactérias do trato digestivo, ou seja, a fermentação ocorreria numa porção mais longa do cólon, favorecendo ainda mais a absorção de minerais no trânsito intestinal, no entanto, Suzuki *et al.* (2006) afirma a superioridade das moléculas de FOS com menor grau de polimerização (GF₂) em detrimento das moléculas de maior polimerização.

Estudos indicam ainda, por exemplo: consumo de FOS por pacientes com câncer devido a uma série de benefícios (Zheng *et al.*, 2006), aumento considerável na absorção de Ca e Mg (Lobo, *et al.*, 2006), melhores benefícios em comparação com a insulina (Stewart *et al.*, 2008), aumento da resistência a doenças e infecções (Zheng *et al.*, 2006) além dos efeitos já bastante comprovados de crescimento seletivo da microflora benéfica ao nosso organismo (Costalos *et al.*, 2008; Huebner *et al.*, 2007) e efeitos anti-cariogênicos e baixo poder calórico (Mysore *et al.*, 2005). E devido a este baixo poder calórico eles podem ser empregados como ingredientes e também como adoçantes numa série de produtos alimentícios inclusive para diabéticos (Mabel *et al.*, 2008; Mysore *et al.*, 2005). Adicionalmente, podem também ser empregados em alimentação animal (Passos & Park, 2003; Tanriseven & Aslan, 2005) ou em uso cosmético e farmacêutico (citados em: Beine *et al.*, 2008; Laskin, 1985).

Os FOS podem ser naturalmente obtidos de frutas, verduras e vegetais (Roberfroid *et al.*, 2001; Tanriseven & Aslan, 2005), mas, a extração destas fontes naturais não é compensatória e a ingestão através de uma dieta balanceada nem sempre é possível. No entanto, grandes quantidades de FOS podem ser obtidas biotecnologicamente através da atividade de transfrutossilção de certas enzimas de microorganismos (Passos & Park, 2003). Sabe-se que os FOS obtidos diretamente de frutos e folhas são formados a partir da frutose ligando-se tanto ao resíduo de frutose quanto da glicose, resultando assim numa cadeia ramificada, diferentemente dos FOS obtidos por meio da ação de enzimas de microorganismos que ligam a frutose apenas aos resíduos de frutose (Muramatsu *et al.*, 1994).

Atualmente, no mercado brasileiro os FOS já podem ser encontrados em formulações de suplementos alimentares como: da SKL Pharma[®] o Lactofos[®] (FOS + 4 cepas de probióticos; custo de 10 sachês/6 g cada = R\$ 38,0 - 45,31) e Fiber FOS[®] (FOS de chicória; custo de 10 sachês/6 g ~ R\$ 76,0), da Vitafor[®] Nutrientes o Fosvita[®] (custo de 500 g ~ R\$ 60,0), da NatureMaxx[®] cápsulas de FOS de chicória FOSFrut[®] (custo de 60 caps./500 mg ~ R\$ 12,0), da

Nestlé[®] o Nutren[®] Active (leite em pó com FOS, inulina, vitaminas, etc.; custo de 400 g ~ R\$ 25,0 – 30,0) e o Ninho[®] Fases 1+ e 3+ (29 g do produto contém 0,6 g de FOS e 0,3 g inulina, custo 400 g ~ R\$ 10,0 – 19,0), da Danone[®] a fórmula infantil de partida Aptamil[®] 1 e o Aptamil[®] 2 indicado a partir dos 6 meses de vida (0,8 g de GOS e FOS em 100 ml preparados; custo de 900 g ~ R\$ 20,0 – 30,0) e da Abbott[®] o Ensure[®] (3,6 g de FOS/100 g; custo 1 kg ~ R\$ 98,63) o Glucerna[®] SR para diabéticos (3% de polissacarídeos de soja e 3% de FOS; custo de 400 g ~ R\$ 45,0 – 47,0) e a fórmula hipercalórica Jevity[®] Plus (10 g/L de FOS e 12 g/L de uma mistura de polissacarídeos de soja + fibra de aveia + goma arábica + CMC; custo de 237 mL ~ R\$ 14,0). Esta pesquisa foi feita diretamente do site dos fabricantes e de sites de farmácias e empresas afins no dia 04/10/11. Alguns produtos como requeijão cremoso, bolachas, iogurtes e leites fermentados também contém FOS em sua formulação mas, como suplementos alimentares a variedade no Brasil, no momento, é maior.

2.3- Frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp.

A cepa *Rhodotorula* sp. LEB-V10 isolada de flores da Mata Atlântica Brasileira apresentou grande potencial de transfrutossilacção devido a sua enzima extracelular frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) de acordo com estudos realizados por Hernalsteens (Hernalsteens, 2006; Maugeri & Hernalsteens, 2007). Esta enzima apresentou em sua forma livre uma maior atividade em torno do pH 4,0 e 65°C, no entanto, foi observado que a maior estabilidade enzimática é obtida em torno de pH 5,0 e em temperaturas inferiores a 60°C (Hernalsteens, 2006; Hernalsteens & Maugeri, 2008). Sínteses de FOS com a enzima livre em pH 4,5 apresentaram rendimentos em torno de 50% e inibição pela sacarose em concentrações superiores a 785 g/L e inibição competitiva pela glicose acima de 75 g/L e pela frutose acima de 50 g/L, sendo que, para a enzima imobilizada em uma liga de nióbio e grafite a constante de inibição pela sacarose foi de aproximadamente 600 g/L (Alvarado-Huallanco, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010). Esta FTase foi caracterizada como sendo um dímero com subunidades de tamanho aproximado de 75 e 124 kDa (Alvarado-Huallanco, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008); alguns autores descrevem ser comum a forma dimérica para frutossiltransferases de diversas origens, microbiana ou vegetal (Lüscher *et al.*, 1996).

2.4- Aspectos gerais sobre a imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas requer um agente imobilizador de acordo com Balcão *et al.* (1996), ou seja, uma força que mantenha a enzima numa fase separada do meio reativo. Essa força pode ser entre duas enzimas (p.e. *cross-linking*) entre a enzima e um composto inerte (p.e. ligação covalente à sílica) ou ainda entre compostos inertes (p.e. inclusão da enzima em cápsulas de alginato). A literatura apresenta diversas técnicas de imobilização simples ou combinadas entre si (Sheldom, 2007), a escolha deve, portanto, respeitar as características finais apresentadas pelo biocatalisador imobilizado e sua aplicação.

A imobilização ocorre normalmente de forma não orientada (*random*), ou seja, é praticamente impossível controlar quais sítios estarão envolvidos na ligação com o suporte e se eles serão ou não necessários à catálise, se forem essenciais isso leva a perda de atividade. Para contornar este problema, muitos autores sugerem que a imobilização seja orientada (*oriented*), ou seja, conduzida sob condições saturadas de substrato, produto ou inibidor competitivo, garantindo assim que os sítios de interesse catalíticos estejam protegidos ou ainda empregando numa segunda etapa compostos como o glutaraldeído, evitando dessa forma que a imobilização da enzima ocorra numa conformação improdutiva (Aguiar-Oliveira, 2007; Chaplin & Bucke, 1990; Guisán, 1998; Woodward, 1985). A orientação da imobilização com glutaraldeído constitui-se uma metodologia combinada de imobilização: p.e. adsorção seguida de *cross-linking* com o glutaraldeído.

2.4.a- Adsorção

A adsorção é uma metodologia amena e de menor impacto sobre a enzima e requer longo tempo de reação, recomenda-se que o contato enzima/suporte ocorra por 16 a 24 horas. Apesar das ligações físicas formadas serem relativamente fortes, ao final do processo, a enzima não se encontra firmemente presa ao suporte e mudanças experimentais como a simples adição do substrato, pH e temperatura podem causar dessorção. Teoricamente, a adsorção imobiliza cerca de 1 g/g (proteína/suporte) enquanto que a imobilização por ligações covalente imobiliza cerca de 0,02 g/g (van-Belien, 2002; Chaplin & Bucke, 1990; Woodward, 1985).

Este tipo de ligação é muito difundido no estudo de colunas cromatográficas por se tratar de um fenômeno de superfície que permite a aderência de determinadas moléculas

chamadas adsorbatos em partículas do adsorvente (suporte que preenche o leito da coluna), seguidos de uma etapa de dessorção das partículas aderidas. A adsorção pode ser classificada como química (forças envolvendo sítios ativos e íons) ou física (sobreposição de interações) (Adamson, 1990; Torres, 2006). Esta metodologia cromatográfica pode ser aplicada também na imobilização de enzimas, uma vez que o sistema enzima-suporte é bioquimicamente semelhante ao sistema adsorbato-adsorvente, daí vem todos os estudos concernentes à estabilidade química do sistema, composição do meio, capacidade máxima de adsorção e estudos referentes à dessorção.

i) Nióbio

Conforme revisão apresentada em trabalho anterior (Aguiar-Oliveira, 2007; Nowak & Ziolk, 1999), o Brasil possui a maior reserva natural de nióbio do mundo e é também o maior produtor mundial. Muitos estudos têm sido conduzidos e já existem diversas aplicações para este minério devido a uma série de peculiaridades química e física como: alta resistência física aos mais agressivos compostos e à corrosão, sendo apenas atacado por ácidos minerais concentrados como ácido fluorídrico puro (HF) ou em mistura com ácido nítrico conhecido como “água-forte” (HF/HNO₃); sob a forma de ácido nióbio apresenta força ácida equivalente a uma solução de ácido sulfúrico 70% e sob a forma de fosfato de nióbio equivale a uma solução de 90% do mesmo ácido, etc. As aplicações atuais deste minério, sob sua forma pura ou como liga são: catalisador químico sólido-ácido, suporte de metais, fotocatalisador, emprego na indústria naval, aeronáutica, automobilística e espacial, fabrico de implantes cirúrgicos, parafusos, trilhos de trem, diamante sintético etc. Sua aplicação como suporte biocatalítico ainda é pouco disseminada. De acordo com cotação realizada em 29/12/2008 (CBMM) o composto comercial utilizado em nossos experimentos e cedido por esta empresa (NB340[®]) tem custo total de US\$ 51,9/kg, um custo bem menor do que o de muitos suportes inorgânicos já bastante difundidos pela literatura.

O emprego de suportes inorgânicos traz uma série de vantagens como, por exemplo, maior estabilidade química e mecânica durante o processo, o que na maioria das vezes é um fator limitante no emprego de suportes orgânicos como observado no estudo de Mammarella e Rubiolo (2009), que avaliaram o efeito da perda da estrutura de esferas de gel aplicadas num biorreator do tipo leito-fixado. Menezes-Blackburn *et al.* (2011) declaram que a

adsorção de enzimas em suportes naturalmente carregados é mais recomendada do que em suportes quimicamente ativados, além do que, as interações eletrostáticas e a biocompatibilidade entre enzima e suporte demonstram ser extremamente dependentes da distribuição de cargas do suporte.

2.5- Efeitos da imobilização

As interações bioespecíficas envolvem o reconhecimento da molécula alvo pelo sítio de adsorção e o ajuste dessa molécula à posição mais adequada através de interações entre o suporte e os resíduos de aminoácidos das proteínas. A complementaridade da interação é por meio da estrutura enzima-suporte, que permite a ligação da molécula ao suporte por ligações covalentes e/ou não covalentes. A conformação espacial da enzima em relação ao suporte ou sítio de adsorção tem papel fundamental na intensidade das interações bioespecíficas. Vale lembrar que enzima e suporte não são estruturas naturalmente complementares e imediatamente após os primeiros pontos de ligação se formar, a enzima perde flexibilidade (Mateo *et al.*, 2006; Nogueira, 1999).

2.5.a- pH

O pH do macro e microambiente tem influência direta sobre a enzima e sua reatividade, estabilidade estrutural e solubilidade. A carga do suporte pode alterar o pH do microambiente, alterando o perfil de pH da enzima após imobilização, e podem ocorrer também alterações conformacionais da enzima devido à protonação induzida por extremos de pH. Muitas vezes o pH ótimo da enzima não corresponde ao ótimo para um processo biotecnológico devido muitas vezes a: variação de solubilidade do substrato e produto, mudança da posição de equilíbrio da reação, ionização do produto, reações adversas, ataque microbiano, etc. (Arroyo, 1998; Chaplin & Bucke, 1990; Reshmi *et al.*, 2007; Trevan, 1980). Alterações no perfil de pH são muito comuns após imobilização, como por exemplo podemos citar o alargamento do perfil de uma glicose-isomerase imobilizada no suporte macroporoso Eupergit C250L (Tükel & Alagöz, 2008).

A enzima FTase imobilizada em um suporte a base de nióbio apresentou deslocamento para uma faixa mais básica de pH em seu perfil após imobilização. Além do pH ótimo (4,5) para a enzima livre, observou-se ótima atividade e estabilidade em pH 6,0.

Este comportamento pode ser explicado pela carga negativa do suporte (Aguiar-Oliveira, 2007).

2.5.b- Temperatura

Sob condições de estresse como escassez de água, extremos de temperatura e de salinidade, as células microbianas produzem e acumulam osmólitos, que são pequenas moléculas orgânicas com função de contrabalancear estresses sofridos protegendo a célula de desnaturação/desativação (Anjum *et al.*, 2000). Porém, quando a enzima está isolada, não mais existe este mecanismo de proteção, sendo imprescindível a aplicação de outra forma de estabilização que viabilize sua aplicação biotecnológica.

Sabe-se que o desdobramento da estrutura terciária proteica leva a perda da funcionalidade enzimática, ocorrendo sua desnaturação. Quando a enzima é submetida a alterações químicas desfavoráveis e ocorre perda irreversível de sua atividade biocatalítica tem-se sua inativação (Ó'Fágáin, 1997). Quando existe o interesse e a viabilidade de se transportar uma propriedade biotecnológica de uma determinada enzima do ambiente laboratorial para o industrial, é imprescindível, dentre outros, os estudos de sua termoestabilidade e termoafinidade. De acordo com Nadeen *et al.* (2007), a capacidade da enzima de resistir ao desenovelamento térmico de sua estrutura em ausência do substrato equivale ao estudo da termoestabilidade, já a habilidade de exercer sua função em presença do substrato e em diferentes temperaturas equivale ao estudo de sua termoafinidade.

A aplicação industrial de biocatalisadores depende de suas estabilidades de estocagem e operacional, afetadas diretamente por condições operacionais e fatores potencialmente desnaturantes. A estabilidade de estocagem, expressa pela meia-vida, refere-se à manutenção da capacidade enzimática e suas habilidades catalíticas entre o tempo de manufatura e uso. A estabilidade operacional descreve a capacidade de a enzima manter-se ativa durante o processo. A termoestabilidade enzimática é função também das interações entre a enzima e o suporte no qual está imobilizada (Boy *et al.*, 1999; Matsumoto & Ohashi, 2003; Ó'Fágáin, 2003; Papinutti *et al.*, 2008). Diversas técnicas possibilitam o aumento da estabilidade enzimática: engenharia de proteínas - citados em Ó'Fágáin (2003) - modificações químicas como *cross-linking*, união a polímeros por ligações covalentes, modificação de superfícies, etc. – Srimathi *et al.* (2006) - adição de compostos estabilizantes

como sais, açúcares, etc. – Papinutti *et al.* (2008) - ou o emprego de solventes orgânicos - Ruth *et al.* (2007).

Fato é que diversos relatos de aumento da estabilidade térmica após a imobilização são conhecidos na literatura, Converti e Borghi (1997) declararam, por exemplo, que apesar de uma pequena contribuição na entalpia do sistema, o aumento da entropia cria uma espécie de barreira energética e o sistema se torna menos sensível às mudanças de temperatura.

i) T_{50} e ativação térmica:

De acordo com Ó'Fágáin (1997), o ponto médio de transição para o desdobramento térmico da proteína pode ser descrito como temperatura de meia-inativação ou de desdobramento, T_{50} . Este parâmetro corresponde à temperatura onde a atividade residual atinge 50% do seu valor inicial após um breve período de incubação, normalmente de 10 a 15 minutos como em Ruth *et al.* (2007) e Ó'Fágáin (1997), respectivamente.

Comumente, os perfis de temperatura obtidos são do tipo sigmoidal, mas é possível obter dados referentes à ativação da enzima numa dada temperatura em comparação com a enzima não incubada. O efeito ativador promovido por pequenos períodos de pré-incubação já é conhecido e Papinutti *et al.* (2008) pré-incubaram a enzima por 30 minutos a 40°C antes de realizar seus experimentos de estabilidade por conhecerem o efeito ativador deste tratamento, aumentando cerca de 50% a atividade enzimática.

ii) Cinética de termo-desnaturação

As relações propostas por Arrhenius (Fogler, 1999) e Eyring (Eyring & Stearn, 1939; Lumry & Eyring, 1954) são bastante conhecidas por pesquisadores quando se discute cinética de desnaturação enzimática. Porém, não são poucos os casos de relato de desvio das relações de primeira ordem que regem essas relações matemáticas. Em Kavanau (1950) é possível encontrar, por exemplo, uma alteração proposta à equação de Arrhenius pela simples substituição do termo (T) por (T - T_0) com bom ajuste. De acordo com Aymard e Belarbi, (2000), Boy *et al.* (1999) e Sadana (1988), o mecanismo de desativação enzimática mais simples é o de primeira ordem e são do tipo predito por Arrhenius e Eyring em que dois estágios enzimáticos são detectáveis.

Muitos dos processos de inativação enzimática não são descritos por equações de primeira ordem. Porém, em alguns casos, uma inativação aparentemente simples e de primeira ordem pode mascarar um conjunto de eventos moleculares complexos. A perda de atividade pode vir a apresentar diferentes valores de energia de desativação (E_{ad}) em fenômenos simultâneos (Ó'Fágáin; 1997). Šikšnis *et al.* (1990) observaram um padrão do tipo “zig-zag” bastante incomum na relação de Arrhenius [$\ln(k_d)$ versus $(1/T)$] onde nas faixas de temperatura entre 40-55°C e acima de 75°C observou-se uma inclinação negativa, normal à relação de Arrhenius, já entre 55-65°C a reta assumiu inclinação positiva. Este fenômeno foi explicado em função da transição conformacional reversível da enzima na faixa de 50-60°C.

Papinutti *et al.* (2008) empregaram em seus estudos com lacase uma equação biexponencial com três parâmetros. Sá-Pereira *et al.* (2004) avaliaram a estabilidade térmica da xilanase com base em um esquema simples de desativação de primeira ordem e um esquema sequencial de desativação envolvendo 1 e 2 estados intermediários, o estudo da adição de trealose demonstrou o aumento da estabilidade bem como da atividade inicial. Ettalibi e Barati (2001) estudaram como a imobilização da inulinase em vidro poroso pode afetar sua estabilidade e ao aplicarem a lei de Arrhenius não observaram nenhuma limitação difusional. Matsumoto e Ohashi (2003) aplicaram um modelo de 2 estágios na desativação enzimática com sucesso.

2.5.c- Substrato

A cinética enzimática após a imobilização pode também ser modificada, devido à interferência do suporte ou das ligações formadas entre a enzima e o suporte. O aumento de K_m significa que uma concentração maior de substrato é necessária para uma mesma taxa de reação observada com a enzima livre (Chaplin & Bucke, 1990; Woodward, 1985). Gopinath e Sugunan (2006) observaram em seus estudos, com 3 enzimas diferentes, que após a imobilização em mesmo suporte ácido ativado: α -amilase de *B. subtilis* apresentou aumento no valor de K_m de até 8 vezes, com glicoamilase de *A. niger* ocorreu uma diminuição de 6% do valor e com invertase de levedura K_m foi aumentado em 14,5 vezes. Com a FTase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 parcialmente purificada observou-se em pH 4,5

um K_m de 197,95 g/L na sua forma livre e um K_m de 148,28 g/L na forma imobilizada em pH 4,5 (Alvarado-Huallanco, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010).

2.5.d- Sais

É conhecido que algumas enzimas necessitam de certos sais para realizar determinadas catálises. De acordo com Chaplin e Bucke (1990), alguns sais necessários à boa reatividade de enzimas podem ser ligados ao suporte onde a enzima será imobilizada ou adicionados ao meio de reação. Resultados obtidos por Hernalsteens (Hernalsteens, 2006; Hernalsteens & Maugeri, 2008) e Aguiar-Oliveira (2007), revelaram que a adição de alguns sais, especialmente o CuSO_4 , apresenta efeito promotor da atividade e estabilidade para a enzima FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 nas formas livre e imobilizada. Resultados semelhantes com este mesmo sal foram observados em trabalho de Papinutti *et al.* (2008) com a enzima lacase.

2.6- Planejamento Experimental

É de grande interesse que um sistema biotecnológico seja otimizado, ou simplesmente melhor compreendido em relação às faixas operacionais e fatores que realmente sejam significativos ao processo. Para isso, a metodologia de análise estatística de estudo de efeitos das variáveis é uma ferramenta de grande aplicação e confiabilidade. Portanto, a escolha da melhor estratégia de estudo das respostas obtidas combinam e exigem dos pesquisadores: técnicas analíticas – estatísticas e matemáticas – e a maior quantidade de informações sobre o processo biotecnológico (Anjum *et al.*, 1997; Baş & Boyaci, 2007; Rodrigues & Iemma, 2009).

Em geral, para um número de variáveis independentes acima de 4, a escolha do tipo de fatorial baseia-se na complexidade, tempo e custo de sua execução. Experimentos delineados em esquemas do tipo fatoriais fracionados (2^{k-1}) são muito úteis em etapas iniciais e, de acordo com Rodrigues e Iemma (2009), quando realizados sequencialmente, permitem que as condições otimizadas sejam atingidas, já que é possível mudar as faixas dos níveis estudados a partir da análise dos efeitos a cada delineamento executado. Planejamentos fatoriais como acima descritos podem ser aplicados não só na otimização de processos, mas também na determinação de constantes cinéticas e estudos de estabilidade enzimática (Baş & Boyaci, 2007).

2.7- Liofilização de proteínas

A grande maioria das proteínas perde atividade apenas estando em solução aquosa ao longo do tempo, pois estão susceptíveis a degradações químicas (p.e. deaminação e oxidação) ou físicas (p.e. agregação e precipitação) e até proteólise por uma enzima de um microorganismo contaminante (Carpenter *et al.*, 1997; Ó'Fágáin, 1997).

A liofilização consiste na remoção da água congelada por sublimação e é recomendada se há um valor comercial agregado à proteína em questão, porque facilita seu transporte, distribuição, estocagem, uso, aumenta a estabilidade, etc. (tanto para fins farmacêuticos quanto alimentícios), mesmo sendo uma técnica de grande gasto energético e de tempo (Aehle, 1990; Cabral *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 1997; Chaplin & Bucke, 1990; Tang & Pikal, 2004). No entanto, a liofilização de moléculas bio-ativas como enzimas é um processo complexo e único para cada sistema. Macromoléculas como as proteínas, existem em estado natural na forma hidratada, resultando em sua estrutura terciária que é fator crítico para manutenção de sua funcionalidade; uma vez desidratadas, sua funcionalidade pode vir a ser severamente comprometida devido à perda de mobilidade conformacional além de uma queda drástica na polaridade da molécula (Lee & Dordick, 2002; Roser, 1990).

Para Partridge *et al.* (1998) um processo eficiente de “desidratação” de enzimas ocorre quando as moléculas de água são retiradas de tal forma que as moléculas consigam manter sua estrutura tridimensional o mais intacta possível, para algumas enzimas a conformação obtida ao final do processo pode ser altamente desfavorável ou não. Ó'Fágáin (1997) e Aehle (1990) afirmam que quanto mais uma enzima conseguir manter o balanço iônico correspondente ao seu pH ótimo, melhor será a preservação de suas funções biocatalíticas. Trabalhos como o de Dosztányi *et al.* (1997) provam que a estabilização de proteínas depende da localização de “centros de estabilização” em sua estrutura, portanto, a forma tridimensional final de uma proteína, com suas interações (cooperativas, covalentes, etc.) entre sítios vizinhos, terá papel fundamental na funcionalidade da molécula. Segundo Ru *et al.* (2001) a adição de certos compostos pode levar a formação de uma camada protetora ao redor da estrutura proteica durante a liofilização.

Durante ou imediatamente após a liofilização (desidratação), transporte, estocagem e reconstituição (reidratação) a enzima pode estar sujeita às condições estressantes e uma

escolha cuidadosa das condições de processamento deve ser conduzida, pois, parte das moléculas pode formar agregados irreversíveis (Carpenter *et al.*, 1997; Hirakura *et al.*, 2004). No entanto, muitos trabalhos tem demonstrado o aumento da atividade de enzimas após a liofilização: Roy e Gupta (2004) obtiveram um aumento de 134 vezes sobre a taxa inicial de reação; Ru *et al.* (2001) obtiveram um aumento de atividade biocatalítica em meios orgânicos em mais de 20.000 vezes; Morgan e Clark (2003) obtiveram um aumento de sua atividade em 10 vezes; Sode e Yasutake (1997) conseguiram aumentar a estabilidade térmica; Wang e Mei (2007) aumentaram em 9-14% a conversão. De acordo com Lee e Dordick (2002) essa ativação após a liofilização pode ocorrer devido aos mais variados mecanismos, por exemplo, o uso de certos aditivos pode aumentar ou diminuir a viscosidade da água: aditivos caotrópicos enfraquecem a interação com a água e aditivos cosmotrópicos exibem uma interação mais forte, portanto, sais cosmotrópicos aumentam a solubilidade de solutos estabilizantes ao redor da proteína.

2.7.a- Compostos crio-protetores e formulações de liofilizados

O aumento da estabilidade de formulados proteicos liofilizados pode ser alcançado adicionando-se diversos compostos. Para reduzir o *stress* sofrido pela proteína são adicionadas moléculas crio- ou lipo-protetoras como açúcares, álcoois, aminoácidos, polietilenoglicóis e polisorbatos; para controlar o ambiente químico são utilizados tampões como fosfato de sódio, citrato, Tris, etc.; como aditivos de volume para controle da pressão osmótica são utilizados manitol e glicina; como agentes complexantes são utilizados EDTA e citrato, para retirar contaminantes como metais pesados; também se recomenda imobilizar a proteína em suportes inertes antes da liofilização (Gibson & Woodward, 1993; Kobayashi *et al.*, 1984; Hirakura *et al.*, 2004; Roser, 1990; Ru *et al.*, 2001) ou ainda, manipular as condições de liofilização como temperatura, pressão, tempo, etc. (Tang & Pikal, 2004), além da etapa inicial de congelamento, pois quanto mais rápida, menores serão os cristais formados e maior a superfície de contato - no entanto, algumas proteínas exigem um congelamento lento (Carpenter *et al.*, 1997).

Muitos destes compostos crio-protetores podem existir nas formas cristalina e amorfa durante e após a liofilização, por isso é necessário ter um bom controle do processo, de forma a obter um formulado final ideal e reprodutível para uso comercial. Moléculas

protetoras devem permanecer em estado amorfo para realizar adequadamente seu propósito na formulação (Hirakura *et al.*, 2004). O controle rígido das condições e produtos utilizados na liofilização é normalmente conduzido em produtos farmacêuticos (Tang & Pikal, 2004), sendo que para fins alimentícios o processo pode ser menos complexo já que o principal objetivo (para qualquer destino final do produto) é obter uma torta liofilizada com considerável atividade enzimática, propriedades físicas adequadas e baixa umidade capaz de ser aplicada para obtenção de algum alimento (Carpenter *et al.*, 1997).

Alguns autores defendem a imobilização da proteína antes da liofilização, como Roser (1990) que desenvolveu uma metodologia de secagem com ar (sob pressão atmosférica) para proteínas imobilizadas em matrizes porosas (como filme plástico poroso, tecido, papel a base de vidro, etc.) impregnada com trealose, ou ainda Partridge *et al.* (1998) que adsorveu enzimas em um tipo de sílica-gel cromatográfica lavando-as com *n*-propanol antes da liofilização, o que permite um maior espalhamento da proteína sob uma superfície muito maior garantindo maior acessibilidade do substrato aos sítios ativos.

3- Referências Bibliográficas

- Adamson, A. W (1990). **Physical Chemistry of Surfaces**. 5ª Ed.; John Wiley & Sons; pp. 422-425.
- Aehle, W. (1990). **Enzymes in Industry: Production and Application**. 2nd Ed., Wiley – VCH, The Netherlands.
- Aguiar-Oliveira, E. (2011). **Modelagem, Simulação e Operação de Biorreatores com Frutosiltransferase de *Rhodotorula sp.* imobilizada em suporte inorgânico**. Relatório Final apresentado à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Projeto de Doutorado: 07/51037-0, Novembro de 2011.
- Aguiar-Oliveira, E. (2010). **Caracterização e estudo da estabilidade térmica das enzimas: invertase de *Saccharomyces cerevisiae* e inulinase de *Aspergillus niger* imobilizadas em suporte inorgânico**. Relatório Final apresentado à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Projeto de Doutorado Sanduiche com bolsa no exterior: 2297-09-4, Abril de 2010.
- Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Imobilização da enzima frutosiltransferase de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Alvarado-Huallanco, M.B. (2010). **Modelagem cinética e simulação de processo de produção de frutooligosacarídeos por frutosiltransferase de *Rhodotorula sp.* livre e imobilizada**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Alvarado-Huallanco M.B. & Maugeri-Filho F. (2011). **Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.*** Catalysis Science and Technology, DOI 10.1039/c0cy00059k.
- Alvarado-Huallanco M.B. & Maugeri-Filho F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.*** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.

- Anjum, M.F.; Tasadduq, I.; Al-Sultan, K. (1997). **Response surface methodology: A neural network approach**. European Journal of Operational Research, 101, 65-73.
- Arroyo, M. (1998). **Inmovilización de enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones**. Ars Pharmaceutica, 39 (2), 23-39.
- Aymard, C. & Belarbi, A. (2000). **Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism**. Enzyme and Microbial Technology, 27, 612-618.
- Balcão, V.M.; Paiva, A.L. & Malcata, F.X. (1996). **Bioreactors with immobilized lipases: State of art**. Enzyme and Microbial Technology, 18, 392-416.
- Barbosa, G.N.O. (2007). **Produção de frutossiltransferase por *Rhodotorula* sp.**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Baş, D. & Boyaci, İ.H. (2007). **Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology**. Journal of Food Engineering, 78, 836-845.
- Beine, R.; Moraru, R.; Nimtz, M.; Na'Amnieh; Pawloski, A.; Buchholz, K. & Seibel, J. (2008). **Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering**. Journal of Biotechnology, 138 (1-2), 33-41.
- van-Belien, J.B. & Li, Z. (2002). **Enzyme technology: an overview**. Current Opinion in Biotechnology, 13 (4), 338-344.
- Bernard, P.; Scior, T.; Didier, B.; Hibert, M. & Berthon, J.Y. (2001). **Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A₂ inhibitors**. Phytochemistry, 55 (6), 865-874.
- Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A. & Corvo, M.L. (2008). **Enzimas em Biotecnologia, Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência, Rio de Janeiro.
- Boy, M.; Dominik, A. & Voss, H. (1999). **Fast determination of biocatalyst process stability**. Process Biochemistry, 34, 535-547.
- Cabral, F.A. (1989). **Estudo cinético da Invertase Livre e Imobilizada em alginato de cálcio**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Cabral, J.M.S.; Best, D.; Boross, L. & Tramper, J. (1994). **Applied Biocatalysis**. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Carpenter, J.F.; Pikal, M.J.; Chang, B.S & Randolph, T.W. (1997). **Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advices**. Pharmaceutical Research, 14 (8), 969-975.
- Catana, R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S.; Fernandes, F. (2005). **Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis**. Food Chemistry 9, 517-520.
- Chaplin, M.F. & Bucke, C. (1990). **Enzyme Technology**; Cambridge University Press.
- Cheetham, P.S.J.; Blunt, K.W. & Bocke, C. (1979). **Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels**. Biotechnology and Bioengineering 21(12), 2155-2168.
- Converti, A. & Borghi, M.D. (1997). **Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation**. Enzyme and Microbial Technology, 21, 511-517.
- Costalos, C.; Kapiki, A.; Apostolou, M. & Papathoma, E. (2008). **The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants**. Early Human Development, 84, 45-49.
- Dostányi, Z.; Fiser, A. & Simon, I. (1997). **Stabilization Centers in Proteins: Identification, Characterization and Predictions**. Journal of Molecular Biology, 272, 597-612.
- Ettalibi, M. & Baratti, J.C. (2001). **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinase from *Aspergillus ficuum***. Enzyme and Microbial Technology, 28, 596-601.
- Eyring, H. & Stearn, A. (1939). **The application of the theory of absolute reaction rates to proteins**. Chemical Reviews, 24, 253-270.
- Fogler, H.S. (1999). **Elements of chemical reaction engineering**. 3rd Ed., Prentice Hall, New Jersey.
- Gibson, G.R.; Probert, H.M.; Loo, J.V.; Rastall, R.A. & Roberfroid, M. B. (2004). **Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics**. Nutrition Research Reviews, 17, 259-275.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995). **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of prebiotics**. The Journal of Nutrition, 125 (6), 1401-1412.

- Gibson, T.D. & Woodward; J.R. (1993). **Enzyme stabilization**. US Patent, 5240843.
- Goldberg, I. (1994). **Functional foods – Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals**. Chapman & Hall Inc., Israel.
- Gopinath, S. & Sugunan, S. (2006). **Enzymes immobilized on montmorillonite: Comparison of performance in batch and packed-bed reactors**. Reaction Kinetics and Catalysis Letters, 88 (1), 3-9.
- Guisán, J.M. (1988). **Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes**. Enzyme and Microbial Technology, 10, 375-382.
- Hernalsteens, S. (2006). **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.*** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.
- Hirakura, Y.; Kojima, S.; Okada, A.; Yokohama, S. & Yokota, S. (2004). **The improved dissolution and prevention of ampoule breakage attained by the introduction of pretreatment into the production process of the lyophilized formulation of recombinant human Interleukin-11 (rhIL-11)**. International Journal of Pharmaceutics, 286, 53-67.
- Huebner, J.; Wehling, R.L. & Hutkins, R.W. (2007). **Functional activity of commercial prebiotics**. International Dairy Journal, 17, 770-775.
- Kavanau, J.L. (1950). **Enzyme kinetics and the rate of biological process**. Journal of General Physiology, 34 193-209.
- Kobayashi, S.; Beppu, K.; Shimizu, H.; Ogawa, S. & Kotani, R. (1984). **Stable enzyme composition**. US Patent: 4451569.
- Kono, T.; Yamaguchi, G. & Hidaka, H. (1994). **Fructose transferring enzyme absorbed on granular carrier for production of fructooligosaccharides**. US Patent: 5,314,810.
- Kuhn, R.C. (2010). **Purificação de fructooligosacarídeos obtidos através de síntese enzimática utilizando colunas de leito fixo e membranas de nanofiltração**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Kuhn, R.C. (2006). **Separação de Oligossacarídeos utilizando coluna de leito fixo de zeólita**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Kuhn, R.C. & Maugeri, F. (2010(a)). **Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column**. New Biotechnology, 27 (6), 862-869.
- Kuhn, R.C. & Maugeri, F. (2010(b)). **Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns**. Journal of Chromatography: B, 878 (22), 2023-2028.
- Laskin, A.I. (1985). **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. Biotechnology Series, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California.
- Lee, M.Y. & Dordick, J. (2002). **Enzyme activation for nonaqueous media**. Current Opinion in Biotechnology, 13, 376-384.
- Lobo, A.R.; Colli, C.; Filisetti, T.M.C.C. (2006). **Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats**. Nutrition Research, 26, 413-420.
- Lumry, R. & Eyring, H. (1954). **Conformation changes of proteins**. Journal of Physical Chemistry, 58, 110-120.
- Lüscher, M.; Erdin, C.; Sprenger, N.; Hochstrasser, U.; Boller, T. & Wiemken, A. (1996). **Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubse of *Heliantus tuberosus***. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 385 39-42.
- Mabel, M.J.; Sangeetha, P.T.; Platel, K.; Srinivasan, K. & Prapulla, G. (2008). **Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics**. Carbohydrate Research, 343, 56-66.
- Mammarella, E.J. & Rubiolo, A.C. (2009). **Effect of biocatalyst swelling on the operation of packed-bed immobilized bioreactor**. Process Biochemistry, 44, 183-190.
- Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, C.C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R. & Guisán, J.M. (2006). **Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins**. Enzyme and Microbial Technology, 39, 274-280.

- Matsumoto, M. & Ohashi, K. (2003). **Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa***. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 75-77.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2008). **Nueva tecnología para producir prebióticos**. *Énfasis Alimentación – Latinoamérica*, Buenos Aires, Año XIV, 9, Octubre, 62-64.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico**. Patente BR: PI 0706083-1.
- Maugeri, F.; Bernal, O.L. & Mukuno, J.L. (2004). **Alimento Funcional Composição Probiótica, Composição Alimentícia e Processo de Produção de Alimento Funcional Fermentado a Base de Soja, Contendo Agetnes Probióticos e Prebióticos**. Patente BR: PI 0404152-6.
- Maugeri, F. & Hernasteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity**. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49 (1-6), 43-49.
- Maugeri, F.; Hernalsteens, S.; Barbosa, G.N.O. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Produção de frutooligosacarídeos a partir de sacarose por enzima, imobilizada ou livre, extracelular de leveduras**. Patente BR: PI 0705359-2.
- Maugeri, F. & Pinheiro, S.A. (2002). **Produção de xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido ou não com frutooligosacarídeos, a partir de sacarose**. Patente BR: PI 0202602-3.
- Menezes-Blackburn, D.; Jorquera, M.; Gianfreda, L.; Rao, M.; Greiner, R.; Garrido, E.; Mora, M. L. (2011). **Activity stabilization of *Aspergillus niger* and *Escherichia coli* phytases immobilized on allophanic synthetic compounds and montmorillonite nanoclays**. *Bioresource Technology*, 102, 9360-9367.
- Morgan, J.A. & Clark, D.S. (2004). **Salt-Activation of Nonhydrolase Enzymes for Use in Organic Solvents**. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (4), 456-459.
- Muramatsu, M.; Nakakuki, T.; Kainuma, S. & Miwa, T. (1994). **Production method of branched fructooligosaccharides**. US Patent: 5,334,516.
- Mysore, N.R.R.; Shivakumara, M.; Sangeetha, P.T.; Prapulla, S.G. & Prakash, M. (2005). **Process for preparation of fructooligosaccharides (FOS)**. US Patent: US 2005/0069627 A1.
- Nadeem, M.; Perveen, R.; Javed, M.R.; Nadeem, H. & Rashid, M.H. (2007). **Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp.** *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 558-564.
- Nogueira, D.A.R. (1999). **Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Nowak, I.; Ziolk, M.; **Niobium Compounds: Preparation, Characterization and Application in Heterogeneous Catalysis**; *Chemical Review*; 99; 36033-3624; 1999.
- Ó'Fágáin, C. (1997). **Stabilizing Protein Function**. Springer, Ireland.
- Ó'Fágáin, C. (2003). **Review, Enzyme stabilization – recent experimental progress**. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 137-149.
- Papinutti, L.; Dimitriu, P. & Forchiassin, F. (2008). **Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases**. *Bioresource Technology*, 99, 419-424.
- Park, J.P.; Bae, J.T. & Yun, J.W. (1999). **Critical effect of ammonium ions on the enzymatic reaction of a novel transfructosylating enzyme for fructooligosaccharides production from sucrose**. *Biotechnology Letters*, 21, 987-990.
- Park, Y.K. & Pastore, G.M. (2002). **Process for preparing beta-fructofuranosidase enzyme and a process for producing fructooligosaccharides**. US Patent: 20020182682, Kind Code: A1.
- Partridge, J.; Halling, P.J. & Moore, B.D. (1998). **Practical route to high activity enzyme preparation for synthesis in organic media**. *Chemical Communications*, 7, 841-842.
- Passos, L.M.L. & Park, Y.K. (2003). **Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos**. *Ciência Rural*, Santa Maria, 33 (2), 385-390.
- Queffelec, B.; Cummins, V. & Bailly, D. (2009). **Integrated management of marine biodiversity in Europe: Perspectives from ICZM and the evolving EU Maritime Policy framework**. *Marine Policy*, 33 (6), 871-877.
- Reshmi, R.; Sanjay, G. & Sugunan, S. (2007). **Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis**. *Catalysis Communications*, 8, 393-399.
- Roberfroid, M.; Flamm, G.; Glinsmann, D.K. & Prosky, L. (2001). **Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41 (5), 353-362.
- Rodrigues, M.I. & Iemma, A.F. (2009). **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 2ª Edição, Casa do Pão Editora, Campinas.

- Roser, B.J. (1990). **Protection of proteins and the like**. US Patent: 4891319.
- Roy, I. & Gupta, M.N. (2004). **Preparation of highly active α -chymotrypsin for catalysis in organic media**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 2191-2193.
- Ru, M.T.; Wu, K.C.; Lindsay, J.P.; Dordick, J.S.; Reimer, J.A. & Clark, D.S. (2001). **Towards More Active Biocatalysts in Organic Media: Increasing the Activity of Salt-Activated Enzymes**. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (2), 187-197.
- Ruth, D.M.; Buckley, S.J.; O'Connor, B.F.O. & Ó'Fágáin, C. (2007). **Solvent and thermal stability, and pH kinetics, of praline-specific dipeptidyl peptidase IV-like enzyme from bovine serum**. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 307-311.
- Sadana, A. (1988). **Enzyme deactivation**. *Biotechnology Advances*, 6, 349-446.
- Santos, A.M.P. (2002). **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.
- Sá-Pereira, P., Carvalho, A.S.L.; Costa-Ferreira, M. & Aires-Barros, M.R.(2004). **Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCM1 966 xylanases with trehalose. Study of deactivation kinetics**. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 278-282.
- Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. & Borzani, W. (2001). **Biotecnología Industrial: Engenharia Bioquímica**. vol. 2, Editora Edgard Blücher LTDA.
- Sheldon, R.A. (2007). **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance**. *Advances in Synthesis and Catalysis*, 349, 1289-1307.
- Shuler, M.L. & Kargi, F. (1992). **Bioprocess Engineering: basic concepts**. Prentice Hall, New Jersey.
- Sode, K. & Yasutake, N. (1997). **Preparation of lyophilized pyrroloquinoline quinine glucose dehydrogenase using trehalose as an additive**. *Biotechnology Techniques*, 11 (8), 577-580.
- Srimathi, S.; Jayaraman, G. & Narayanan, P.R. (2006). **Improved thermodynamic stability of subtilisin *Carlsberg* by covalent modification**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 301-307.
- Stewart, M.L.; Timm, D.A. & Slavin, J.L. (2008). **Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system**. *Nutrition Research*, 28, 329-334.
- Suzuki, N.; Aiba, Y.; Takeda, H.; Fukumori, Y. & Koga, Y. (2006). **Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria**. *Bioscience and Microfla*, 25 (3), 109-116.
- Šikšnis, V.; Mozhaev, V.V.; Galkantaite, N.; Melik-Nubarovb, N. S.; Denisa, G. & Martinekc, K. (1990). **Unusual (zig-zag) temperature dependence of the rate constant for irreversible inactivation of hydrophilized enzymes**. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 55, 1366-1371.
- Tang, W.L. & Zhao, H. (2009). **Industrial biotechnology: Tools and applications**. *Biotechnology Journal*, 4, 1725-1739.
- Tang, X. & Pikal, M.J. (2004). **Design of Freeze-Drying Process for Pharmaceuticals: Practical Advice**. *Pharmaceutical Research*, 21 (2), 191-200.
- Tanrisiven, A. & Aslan, Y. (2005). **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides**. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 550-554.
- Torres, M. A. (2006). **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na absorção das proteínas BSA e lisozima**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Trevan, M.D. (1980). **Immobilized Enzymes – an Introduction and Applications in Biotechnology**. John Wiley & Sons, New York.
- Tükel, S.S. & Alagöz, D. (2008). **Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose**. *Food Chemistry*, 111, 658-662.
- Wang, Y. & Mei, L. (2007). **Lyophilization of Lipase with Cyclodextrins for Efficient Catalysis in Ionic Liquids**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103 (4), 345-349.
- Woodward, J. (1985). **Immobilised cells and enzymes: a practical approach**. IRL Press, Washington DC.
- Yun, J.W. (1996). **Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application**. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 107-117.
- Zheng, S.; Steenhout, P.; Kuiran, D.; Qihong, W.; Weiping, W.; Hager, C.; Haschke, F. & Clemens, R.A. (2006). **Nutritional support of pediatric patients with cancer consuming an enteral formula with fructooligosaccharides**. *Nutritional Research*, 26, 154-162.

An Article Submitted to

*International Journal of Food
Engineering*

Manuscript 1894

Characterization of the immobilized
fructosyltransferase from *Rhodotorula*
sp.

Elizama Aguiar-Oliveira*

Francisco Maugeri†

*University of Campinas, elizama@fea.unicamp.br

†University of Campinas, maugeri@fea.unicamp.br

Copyright ©2010 The Berkeley Electronic Press. All rights reserved.

Resumo

A caracterização do biocatalisador composto pela frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. e imobilizada em uma liga de nióbio e grafite (Nb) por adsorção apresentou interações importantes entre a enzima e o suporte. A eficiência de imobilização (ϵ_{imob}) observada foi de $\sim 0,98$ com relação à atividade enzimática oferecida à imobilização resultando numa imobilização máxima de 340 U_i por g de biocatalisador; a adição de sacarose ao meio de dispersão da adsorção desacelerou a adsorção resultando ao final num biocatalisador com ϵ_{imob} entre 0,92 e 0,94; a adição do sal estabilizante CuSO₄ ao meio de dispersão afetou ainda mais com ϵ_{imob} entre 0,78 e 0,88. Estes resultados indicam em conjunto com os resultados apresentados no Capítulo 3 que a sacarose em meio de dispersão da adsorção não afeta o desempenho biocatalítico, sugerindo que os sítios ativos não participam da imobilização; já com o CuSO₄ seus íons indicam interagir com a estrutura da molécula proteica de forma a ocluir os sítios ativos pois sabe-se que seu efeito estabilizador é significartivo. A incubação da FTase imobilizada revelou que a 60°C a meia-vida ($t_{1/2}$) é aumentada em 2,24 vezes em presença do CuSO₄, efeitos muito menos significativos foram observados com MnCl₂ e NaCl. A meia-vida ($t_{1/2}$) estimada para a enzima imobilizada em 48 e 50°C em pH 6,0 apresentou valores de 2 a 2,25 vezes maiores que em pH 4,5. Após a imobilização foi possível observar um segundo ponto distinto de máxima atividade enzimática além do pH 4,5 definido para a enzima livre, o pH 6,0; assim como observado com a enzima livre, a imobilização apresentou inibição pelo substrato para concentrações acima de 600 g/L e temperatura ótima em pH 4,5 foi estimada em 62°C e em pH 6,0 em 64°C. A síntese de FOS apresentou conversões (Y_{FOS}) após 96 h de 0,57-0,59 em pH 6,0 e 0,55-0,56 em pH 4,5; foi possível observar que o aumento da concentração enzimática na síntese (U_i/mL) acelera a reação assim como comprovado no Capítulo 4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que a imobilização ocorre por deposição na superfície e que as partículas de nióbio apresentam porosidade superficial. A orientação da imobilização com glutaraldeído e sacarose, através da adição de uma nova etapa ao final do processo de adsorção, apresentou um pequeno aumento no valor de ϵ_{imob} , no entanto, reduziu a estabilidade térmica.

Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

E. Aguiar-Oliveira & F. Maugeri

Abstract

The fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. recovered from a fermented medium, by precipitation, was immobilized by adsorption onto niobium-graphite alloy. Considering the biocatalyst system, the activity/pH profile moved towards more alkaline values as compared to the free enzyme system, indicating that the support affected the charge distribution between the enzyme and the support. The immobilized enzyme showed high activity and good stability at pH values of 4.5 and 6.0. The biocatalyst half-lives at 48°C and pH values of 4.5 and 6.0 were 32 and 72 days, respectively. The kinetics for the immobilized system corresponded to that of substrate inhibition. The synthesis of fructooligosaccharides from 50% sucrose solutions was carried out in batch stirred reactors and the conversion was about 58%, similar to that with the free enzyme. Based on the biocatalyst activity, stability and process yields, the system developed in this work can be considered suitable for application in large-scale bioreactors.

Keywords: Adsorption, Biocatalyst Stability, Effect of Enzyme Immobilization, FOS, Fructooligosaccharides Synthesis, Niobium.

1- Introduction

Fructooligosaccharides (FOS) are oligosaccharides composed of “n” chain linked fructosyl groups (GF_n , $n = 2-4$) in the position β -2,1 of sucrose, and have been classified (Gibson & Roberfroid, 1995) as prebiotics (functional food) due to their selective action in promoting the development of intestinal micro flora known as probiotics, beneficial to the organism. Their principal components are: kestose (GF_2), 1-nystose (GF_3) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF_4) and since they cannot be metabolized by the human organism, they can also be employed as sweeteners in drinks and milk products, for example (Mysore *et al.*, 2005). FOS can be naturally obtained from fruits, greens and vegetables (Tanriseven & Aslan, 2005). However, large quantities of FOS are produced biotechnologically by means of the transfructosylation activity of certain microbial enzymes (Ghazy *et al.*, 2007). A yeast of the genus *Rhodotorula*, isolated from flowers from the Brazilian Atlantic Forest (Maugeri & Hernalsteens, 2007), produces an extracellular dimeric enzyme that, according to characterisation studies (Hernalsteens & Maugeri, 2008), has shown to be attractive for transfructosylation reactions. This genus is commonly related to the production of lipids (Sacchetti *et al.*, 2005) and carotenoids (Park *et al.*, 2007), but in the present work, it was the source of fructosyltransferase (FTase; EC 2.4.1.9), one of the enzymes related to the production of FOS (Ghazy *et al.*, 2005).

The production of FOS by immobilized enzymes involves two concepts showing considerable expansion in recent years: the industrial application of immobilized enzymes and functional foods. The option for immobilization is mainly due to the better possibilities for reaction control and for the reuse of the biocatalysts, as well as permitting their use on an industrial scale (Muramatsu *et al.*, 1994). Different methodologies – such as the use of the enzyme in its free or immobilized form – and different types of enzyme originating from bacteria, fungi or yeasts – have been used or suggested for use in the production of FOS. However, even though the possibilities are many, many also are the difficulties faced in reproducing a large number of these methodologies in different countries, difficulties such as: cost, commercial availability of the supports or reagents involved in the process, obtaining the enzyme and complex methodologies. On a laboratory scale none of these are

regarded as a problem, since they are dealt by a qualified team and in a controlled environment, but when shifted to an industrial environment they may result in the process becoming unfeasible.

The goal of this work was to develop and characterize a biocatalyst having niobium-graphite alloy as support. Adsorption was the immobilization method used because its reduced loss of enzyme activity as compared to the other methodologies, relatively simple methodology and no use of highly toxic reagents, and niobium-graphite alloy was chosen because of its good mechanical resistance, innovative character, since there were no reports in the literature about this support been used for any enzyme immobilization, low cost (US\$ 51.9/kg – CBMM on 29/12/08), good availability and possibility of reuse (Aguiar-Oliveira, 2007). The results are presented herein and are part of a Brazilian patent (Maugeri *et al.*, 2007) about FOS production using yeast enzymes, unlike other processes which use filamentous fungi and bacterial enzymes.

Brazil possesses the world's largest natural reserve of niobium, which is employed for various purposes in the chemical, naval, aeronautical and space industries, etc., which most benefit from its physical, chemical and mechanical properties (Tanabe, 2003; Tanabe *et al.*, 1989). Its biotechnological application as a support for immobilized enzymes is quite recent, however its availability in Brazil, along with its high resistance endow this alloy with great application potential. The goals of this work are to evaluate the applicability of the niobium as a support for immobilization of the extracellular fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. and to obtain relevant information about the biotechnological application of the biocatalyst.

1.1- Practical Applications

The extracellular fructosyltransferase (FTase) from yeasts of the genus *Rhodotorula* has shown bio-catalytic performance very similar to that of enzymes involved in well-defined commercial processes for the production of fructooligosaccharides (FOS), both in the free and immobilized forms, representing an alternative to conventional processes. As a first step, the study and knowledge of the characteristics and action mechanisms of the enzyme are essential, for a subsequent transfer of the technology used for FOS production on a laboratory scale, to an industrial scale. One of the objectives of the present study was

to present technology to obtain a suitable enzyme solution and prepare a technologically viable biocatalyst to provide good biotechnological performance and reproducibility. The partial purification of the enzyme – just by precipitation – makes the process less onerous and has been shown to provide transferase activity sufficient for the proposed objective.

2- Material and Methods

2.1- Materials

The strain of *Rhodotorula* sp. (LEB-V10: Laboratory of Bioprocess Engineering, UNICAMP), like other strains isolated in a previous study (Maugeri & Hernalsteens, 2007), is maintained in stock on agar slope. The industrial substrates, sugar cane molasses and corn steep liquor, were kindly provided by *The Usina Esther* – Campinas-SP/Brazil and Corn Products – Mogi Guaçu-SP/Brazil, respectively. An enzymatic glucose-oxidase kit from LaborLab® (Guarulhos/São Paulo, Brazil) was used to determine the hydrolytic enzyme activity. The solid-acid niobium-graphite (~95% Nb) compound, used as the support, was manufactured and provided by the Brazilian Company of Metallurgy and Mining (CBMM; Brazil). All the other reagents used were acquired from reliable, available commercial sources.

2.2- Microrganism and Enzyme

The *Rhodotorula* sp. yeast was cultivated in a medium containing corn steep liquor and sugar cane molasses treated with activated charcoal, according to the methodology developed in the author's laboratory by Mendes (Mendes, 2006). Cultures were carried out at 30°C in 500 mL shaken flasks (250 rpm), 100 mL of medium, for about 24 hours and the work volume for cultivation was about 5 L. The medium was centrifuged after the microorganism cultivation at 5°C, 10,000 g for 10 min. Cells were discarded and the supernatant submitted to precipitation by the addition of anhydrous ethanol at -20°C to a proportion of 70% of the final total volume (Hernalsteens & Maugeri, 2008; Maugeri & Hernalsteens, 2007). The reaction was carried out in jacketed reactors at 2°C with mild agitation. After adding the alcohol, the medium was centrifuged and the precipitate re-suspended in a 50 mM acetate buffer, pH 4.5, this suspension corresponding to the concentrated enzymatic solution used in the experiments. This methodology showed an

efficiency of 84 to 86% with respect to recovery of the enzyme from the fermented medium.

No further enzyme purification step was applied, since the activity of the transfructosylation and degree of purity present in the precipitate were adequate for the proposed purpose, allied to the fact that the methodology was of low cost and easy to reproduce in an industrial environment.

2.3- Inorganic support

The solid-acid niobium-graphite compound showing a rupture force of 30 N/mm, was ground in a bench mill and particles between 65 and 80 mesh (180 – 212 μm) were separated using a vibrating screen normally used for granulometric analyses. The particles, showing a sandy appearance and dark grey color, were cleaned by washing in a concentrated solution of nitric acid, followed by drying at 80°C for 12 hours (Janolino & Swaisgood, 1997).

By applying nitrogen gas adsorption isotherm methodology and fitting to the BET equation, it was possible to determine the following structural properties of the particles: surface area of 108 m^2/g , pore volume of 0.1394 cm^3/g , and pore diameter of 25.82 Å. The compound density was determined using pycnometers, giving a value of $\rho = 2.73 \text{ g/cm}^3$.

2.4- Determination of the enzymatic activity and related parameters

One transfructosylation activity unit (U_{TF}) was defined (Chen & Liu, 1996; Hidaka *et al.*, 1998) as 1 μmol of fructose transferred (F_{T}) /minute (Equation 1), one hydrolytic activity unit (U_{H}) as 1 μmol of glucose liberated (G) / minute (Equation 2) and one immobilized activity unit (U_{i}) expressed one transfructosylation activity unit/g of support (Equation 5). The standard determination of the enzymatic activity was carried out at 60°C in a 50 mM / pH 4.5 acetate buffer with 50% sucrose (w/v) (Hernalsteens & Maugeri, 2008). The reducing sugars (RS) were determined by Somogyi-Nelson methodology (Somogyi, 1945; Nelson, 1944) and the glucose using an enzymatic glucose-oxidase kit. Calculation of the activity was performed on the basis of Equations 1 to 6.

$$U_{\text{TF}} = F_{\text{T}} = 2G - \text{RS} \text{ } [\mu\text{mol}/\text{min}] \quad (01)$$

$$U_{\text{H}} = G \text{ } [\mu\text{mol}/\text{min}] \quad (02)$$

Considering that:

$$RS = F + G \Leftrightarrow F = RS - G \quad (03)$$

$$F_T = G - F \Leftrightarrow F_T = 2G - RS \quad (04)$$

Thus:

$$U_i = U_{TF}/g \text{ } [\mu\text{mol}/\text{min.g}] \quad (05)$$

$$U_{iH} = U_H/g \text{ } [\mu\text{mol}/\text{min.g}] \quad (06)$$

The ratio between transfructosylation activity (U_i or U_{TF}) and hydrolytic activity (U_{iH} or U_H) expressed the strength of transfructosylation over hydrolysis, and was used to understand the enzymatic behaviour, since these two activities are known as FTase (Hernalsteens & Maugeri, 2008). The efficiency of immobilization (ϵ_{immob}) expressed the ratio between the enzymatic activity effectively immobilized (U_i) and total enzymatic activity submitted to immobilization (U_o), as shown in Equation 7; by definition, U_o corresponds to the ratio between the enzymatic activity of the concentrated solution (U_{TF}) submitted to immobilization and the weight of the support (g). The residual activity throughout the time (R_T^t) was determined according to Equation 8 to monitor enzymatic activity losses with time for both the immobilized and free enzymes. For this purpose, some definitions were provided: U_i^o and U_{TF}^o corresponding to the initial enzymatic activities determined at time zero (t_0), and U_i^t and U_{TF}^t corresponding to the initial enzymatic activities determined at time t.

$$\epsilon_{immob} = \frac{U_i}{U_o} \quad (07)$$

$$R_T^{t(\min)} = \frac{U_i^t}{U_i^o} \Leftrightarrow \frac{U_{TF}^t}{U_{TF}^o} \quad (08)$$

2.5- Enzyme Immobilization

Immobilization was performed according to Maugeri & Aguiar-Oliveira (2007), by adsorption of the enzyme onto niobium, the dispersion medium (standard medium) being a 50 mM / pH 4.5 acetate buffer. The standard process consisted of two steps: the first with mild agitation for 1 hour and the second under static conditions and low temperatures (4 - 6°C) for 18 hours. This process is usually performed with 8 to 10 g of niobium, covered by

enzyme solution in a volume about twice as high as the support volume, enough to cover all support particles.

a) Effect of enzyme concentration: different enzyme concentrations were added to 1 g of the support (U_o) and evaluated in triplicate. After applying the standard immobilization methodology, the final immobilized activity (U_i) was determined according to item 2.3 and the immobilization efficiency (ϵ_{immob}) obtained according to equation 7. Different immobilization ratios, between 117 and 205 U_o , were evaluated.

b) Effect of contact time and the addition of sucrose and CuSO_4 on enzyme immobilization: the effectiveness of enzyme adsorption on the niobium surface in relation to the contact time was evaluated in triplicate throughout the second step of immobilization, at intervals of 2, 4, 7, 11 and 18 hours, and expressed in terms of ϵ_{immob} (Equation 7). Five dispersion media were evaluated, based on the standard formulation: one standard formulation, two with the addition of sucrose at concentrations of 4 and 8% (w/v) and two with the addition of CuSO_4 at concentrations of 5 and 10 mM.

c) Oriented immobilization: this effect was evaluated by the addition of a third orientation step to the enzyme immobilization process (Wilchek & Miron, 2003). After the second step (standard methodology), the biocatalyst was again submitted to the same static and temperature conditions for a further 18 hours using two standard formulation media containing 2.5% (v/v) of glutaraldehyde, and a combination of 2.5% (v/v) of glutaraldehyde and 4% (w/v) of sucrose. The immobilization efficiency was determined according to Equation 7, and the biocatalyst then incubated in a standard medium for 35 min. at 65°C, and its thermal stability evaluated in terms of residual activity R_{65}^{35} (Equation 8, residual activity after incubation at 65°C for 35 min). The experiments were performed in triplicate.

2.6- Characterisation of the biocatalyst

The biocatalyst half-life ($t_{1/2}$) (Ghazy *et al.*, 2007) was firstly evaluated with respect to the effects of different pH values and salt additions to incubation medium. The pH influence revealed two different pH values, which were both used to characterize the catalyst, according to the influences of the temperature and substrate concentrations. Microphotographies of the surface of the clean niobium particles and of the biocatalyst

were also obtained as additional information. All the experiments were carried out in triplicate and the standard deviations determined for each point.

a) Salt: the effect of salt on $t_{1/2}$ was evaluated by separately adding 10 mM of the salts CuSO_4 , MnCl_2 and NaCl to the incubation buffer solution. The residual activity (Equation 8) was followed throughout the incubation time at the temperatures of 60, 63 and 65°C, to obtain the half-life ($t_{1/2}$). Consequently, the effect of the salt addition on the biocatalyst half-life was determined from the ratio between the half-life with the salt and that without the salt, under standard conditions ($t_{1/2}^{\text{salt_sample}} / t_{1/2}^{\text{standard}}$).

b) pH: to determine the effect of pH on $t_{1/2}$, incubations at pH values of 3.0, 5.0, 5.5, 6.0 and 6.5 were evaluated, pH 4.5 being considered the standard condition. The residual activity was determined throughout the incubation times at 60, 63 and 65°C to obtain $t_{1/2}$ at each pH similarly to that described in item 2.6.a. Therefore the effect of the pH on the half-life of the biocatalyst was determined from the ratio between the half-life at the pH evaluated and that obtained at the standard pH value of 4.5 ($t_{1/2}^{\text{pH_sample}} / t_{1/2}^{\text{pH 4.5}}$). The pH values 3.5 and 4.0 were also evaluated and the enzyme activities determined as described in item 2.4, only changing the pH of the reaction conditions.

c) Temperature: the effect of the temperature was evaluated at 45, 50, 55, 60, 65, 68, 70 and 73°C at pH 4.5 and 6.0. The enzyme activities were determined as described in item 2.4, only changing the temperature of the standard conditions.

d) Substrate: the effect of the sucrose concentrations was evaluated at 0, 100, 200, 300, 500, 600 and 700 g/L at pH values of 4.5 and 6.0. The enzyme activities were determined as described in item 2.4, only changing the sucrose concentration of the standard conditions.

e) Image analysis: microphotographs of the support particles at different magnitudes, with and without the immobilized enzyme, were taken using a JSM5900 LV scanning electron microscope (SEM) at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS-Brazil). The images were generated by the secondary electrons technique (SEI). The pure particles received no kind of pre-treatment. However, in order to obtain the microphotographs with

the immobilized enzyme in a low vacuum, the biocatalyst was frozen and freeze-dried and then re-covered in a fine layer of gold.

2.7- FOS synthesis

FOS syntheses were performed in stirred tank micro-reactors with an initial sucrose concentration of 500 g/L in 50 mM acetate buffer at pH 4.5 and 6.0, with 7 and 14 U_i/mL of enzymatic activity, with a total reaction volume of 5 mL. Samples of 20 μL were taken and the synthesis products identified and quantified by means of an ion chromatography system (HPLC-PAD) fitted with an amperometric pulse detector and a CarboPac (240 x 4mm) column with a CarboPac PA100 (50 x 4 mm) guard column (Hernalsteens & Maugeri, 2008). The conversion of sucrose into FOS (Y_{FOS}) and its composition (φGF_n) were determined according to Equations 9 and 10, respectively, where [GF⁰] was the initial sucrose concentration, [FOS^t] the total FOS concentration at time t, and [GF_n^t] the concentration of the component (2 < n < 4) at time t.

$$Y_{\text{FOS}} = [\text{FOS}^t]/[\text{GF}^0] \quad (09)$$

$$\phi\text{GF}_{n=2-4} = [\text{GF}_n^t]/[\text{FOS}^t] \quad (10)$$

3- Results and Discussion

3.1- Immobilization

a) *Effect of enzyme concentration:* The results in Figure 1 show that for U_o below 164 U_{TF}/g, the ε_{immob} values were around 0.97, which means that 164 U_{TF}/g is nearly the maximum capacity of adsorption. For U_o values above 170 U_{TF}/g considerable enzyme was lost, proving there was an excess of it, causing low immobilization efficiency, with ε_{immob} values varying from approximately 0.75 to 0.5. The purity of the enzyme exerts a great influence on the immobilization efficiency, as observed in the immobilization of purified β-fructofuranosidase in a metacrylate polymer, with ε_{immob} = 1.0 for a U_o of 400 U/g (Chang *et al.*, 1997), whereas with the non-purified enzymatic chemical product the value for ε_{immob} was 0.96 for a U_o of 134.5 U/g (Tanriseven & Aslan, 2005). This may explain why the maximum immobilization yield in this work was less than 1.0, since the enzyme in this

work was partially purified; considering the purified form it was obtained recently in our laboratory 340 U_{TF}/mL (Alvarado-Huallanco, 2010).

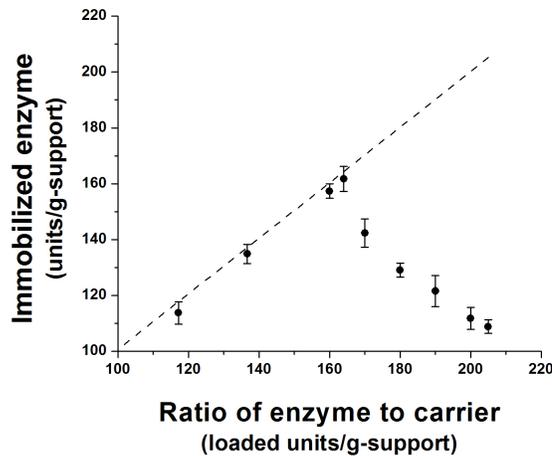


Figure 1: Effect of enzyme activity on the immobilization onto a niobium support. The dashed line indicates an ideal situation where $\epsilon_{\text{immob}}=1.0$.

b) Effect of contact time and of the addition of sucrose or CuSO_4 : adsorption is one of the simplest methods of immobilization and begins immediately after contact has been established between the enzyme and the support in a suitable dispersion medium. In some cases (Ghamgui, 2007), the immobilization of purified enzymes is satisfactorily attained (more than 90% off immobilization) in 30 minutes, while in the present work, since a partially purified protein solution was used, immobilization was slower, probably due to the extra proteins present besides the enzyme of interest, competing for the particle surface sites. Figure 2 shows that under the standard conditions, 65% of the enzyme submitted to immobilization was adsorbed onto the surface of the particles in two hours of contact. The addition of sucrose retarded enzyme immobilization, probably due to the fact that its reactive sites were protected by the sugar molecules (Wilchek & Miron, 2003), thus reducing the number of sites available for immobilization, a condition overcome with time, probably indicating exhaustion of the sucrose in the medium. The objective of adding the salt CuSO_4 was to evaluate if the presence of this salt, which promotes enzyme stability at high temperatures (according to item 3.2.a), would affect the enzyme adsorption profile in any way.

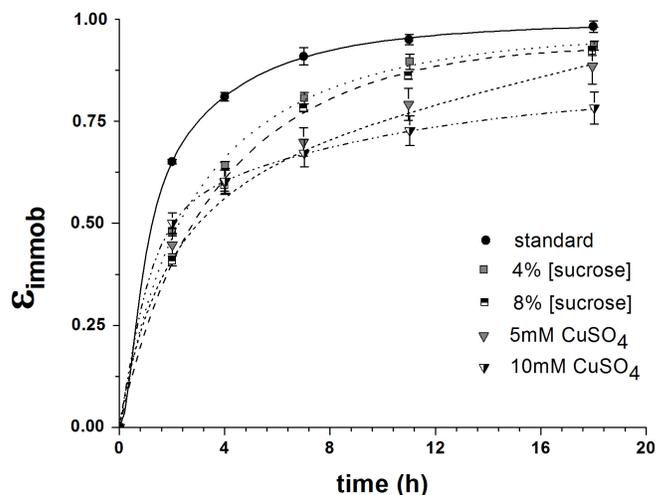


Figure 2: Yields of immobilized FTase during incubation in 50 mM acetate buffer, pH 4.5 under the conditions: standard [dark circle], with 4% (w/v) sucrose [white triangle], with 8% (w/v) sucrose [grey triangle], with 5 mM CuSO₄ [white square] and with 10 mM CuSO₄ [grey square]. Bars indicate the standard deviation.

Furthermore, it appears that the greater the concentration of sucrose, and even more so that of the salt CuSO₄, the greater was this effect. After 11 hours of immobilization, more than 90% of efficiency was observed under the standard condition and under the condition with only 4% of sucrose. At the end of 18 hours of contact the ϵ_{immob} showed a value of 0.98 ± 0.01 under the standard condition, 0.94 ± 0.01 in the presence of 4% sucrose and 0.92 ± 0.01 with 8% of sucrose (with an assurance limit of 90%). The salt CuSO₄ also disfavored adsorption, since after 18 hours of incubation the value for ϵ_{immob} was only 0.88 ± 0.03 and 0.78 ± 0.04 in the media containing 5 and 10 mM respectively (Figure 2).

c) Oriented immobilization: many authors (Lóps-Gallego *et al.*, 2007; Wilchek & Miron, 2003) have suggested the addition of post-immobilization steps, or orientation, with the aim of increasing the stability by promoting a multi-interaction between enzyme and support, since the random (two step) processes do not necessarily lead to optimum conformational stability. Nevertheless, orientation should be done with care, since this multi-interaction may hinder enzymatic activity (Wilchek & Miron, 2003). Therefore, the effects of glutaraldehyde as a covalent binding forming type agent, and of the enzyme substrate sucrose (under conditions of saturation the active sites are protected against being used in the immobilization process), were evaluated. The results for fructosyltransferase are shown

in Table 1, the standard dispersion medium of the third step added to the methodology being composed of 2.5% of glutaraldehyde, with and without 4% sucrose.

Table 1: Effect on immobilization efficiency (ϵ_{immob} - Eq.7) and residual activity (R_{65}^{35} - Eq.8) for standard random immobilization methodology (2 steps) and oriented (3 steps) in a medium containing glutaraldehyde at 2.5% (v/v), with and without 4% (w/v) of sucrose.

	2 steps (random)	3 steps (oriented)	
		Glutaraldehyd [2.5% (v/v)]	Glutaraldehyd [2.5% (v/v)] + Sucrose [4% (w/v)]
ϵ_{immob}	0.954 ± 0.005	0.969 ± 0.004	0.976 ± 0.001
R_{65}^{35}	0.564 ± 0.002	0.442 ± 0.002	0.447 ± 0.005

The immobilization efficiency (ϵ_{immob}) was moderately higher after the post-immobilization treatment, the addition of sucrose indicating slightly greater efficiency. However, on evaluating the thermal stability of the biocatalyst, expressed by R_{65}^{35} (Eq. 8; residual activity after incubation at 65°C for 35 min), it was shown that orientation failed to increase stability, and there was even a loss of activity of about 20% as compared to the standard non-oriented methodology. Other authors had already observed that the use of glutaraldehyde promoted greater enzyme retention, but that manipulation led to a greater loss of activity (Manolov *et al.*, 2008; Wilchek & Miron, 2003). The above results showed that the standard immobilization methodology was better than the other conditions assayed. Studies comparing the thermal stability of the fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in both forms free and immobilized were performed and it has been shown that at temperatures below 51°C the thermal stability of the biocatalyst is higher than the one for free enzyme, and also that the opposite occurs at temperatures above 52°C (Aguar-Oliveira & Maugeri, 2011).

3.2- Characterisation of the immobilized biocatalyst

a) The effect of salt on thermal stability: According to section 2.6.a, the data for $t_{1/2}$ under the absence and presence of salts, expressed as $(t_{1/2}^{\text{salt_sample}} / t_{1/2}^{\text{standard}})$ were obtained and analyzed at 60, 63 and 65°C. The addition of CuSO_4 showed the best effects on $t_{1/2}$ for all temperatures analyzed: at 60°C, $t_{1/2}$ was approximately 2.24 times higher than that of the standard sample, and at 65°C, it was 1.35 times higher. This effect has been reported with

the same salt, and suggested that at high temperatures certain enzymes liberate copper ions, and that the addition of this salt to the medium prevents long time enzymatic inactivation (Henry & Chapman, 2002; Hernalsteens & Maugeri, 2008; Papinutti *et al.*, 2008). In the case of the salts $MnCl_2$ and $NaCl$ the effect was far less significant at 60 and 63°C, whereas reduced $t_{1/2}$ at 65°C; both salts presenting $(t_{1/2}^{salt-sample} / t_{1/2}^{standard}) < 1.0$. The half-lives estimated under standard conditions at temperatures of 60, 63 and 65°C were: 223.60, 55.45 and 33.49 min. respectively.

b) Effect of pH on thermal stability: Similar to the section above, the values for $t_{1/2}$ for each pH value were related to the $t_{1/2}$ at the standard pH (4.5) and the same temperature. pH 6.0 promotes the highest stability when compared with the standard condition, at all temperatures: the $t_{1/2}$ at 65°C was 1.45 times greater at pH 6.0 than that at pH 4.5. pHs 5.5 and 6.5 also presented a ratio $(t_{1/2}^{pH-sample} / t_{1/2}^{pH4.5}) > 1.0$ at some of the temperatures, but in far less significant proportions: at 63 and 65°C for pH 5.5 and at 65°C for pH 6.5. The pH values of 3.0 and 5.0 did not benefit the biocatalyst at any condition. Similar to the results in section 3.2.a, the half-lives under standard conditions at temperatures of 60, 63 and 65°C were: 223, 55 and 33 min., respectively.

c) Influence of pH on biocatalyst activity: The influence of pH on enzyme activity, as shown in Figure 3, presented a different effect as compared to the free enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008), where a single maximum point was determined around pH 4.5. It is well-known that niobium has a strong negative charge (Tanabe, 2003; Tanabe *et al.*, 1989), which leads to a shift in the optimum pH of immobilized enzymes to more basic values, or, in many cases, to a broadening of the profile (Sanjay & Sugunan, 2006). Negatively charged supports tend to promote proton partition when cations concentrate on their surfaces, resulting in a pH value of the enzyme microenvironment different from that of the dispersion medium pH (Trevan, 1980). In such cases, the effect of the H^+ concentration in the vicinity of the enzyme clearly affects the functionality of their active sites, consequently altering their pH profile. It is also of great importance to emphasize that the immobilization of polymeric enzymes promotes different profiles and behaviours. Some authors have suggested that in the case of dimeric enzymes like FTase for example (Hernalsteens & Maugeri,

2008), immobilization only takes place with one of the sub-units, leaving the other sub-unit free, and that this may affect enzyme functionality in many aspects.

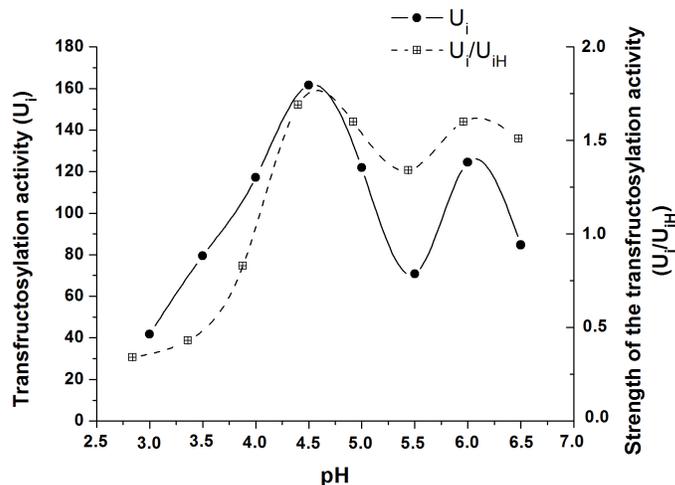


Figure 3: Effects of pH on immobilized FTase: transfructosylation activity, U_i (continuous line) and the ratio with hydrolytic activity, U_i/U_{iH} (dotted line).

The results showed that immobilization of the FTase on niobium had a strong effect on the enzyme behavior and that this effect took place in the microenvironment, in the vicinity between the enzyme and the particle surface. The effects of pH on the biocatalyst revealed two peaks of maximum activity, with marked differences between them: pH 4.5 and 6.0. The ratio U_i/U_{iH} indicated that at pH values below 4.5 there was an increase in sucrose hydrolysis in detriment of the activity of interest, meaning that this was not a suitable working range. Under standard conditions (50 mM acetate buffer / pH 4.5 / 60°C), the ratio U_i/U_{iH} – which expresses the strength of the transfructosylation activity – was around 1.6, indicating that hydrolysis was satisfactorily lower than transfructosylation. Thus the transfructosylation strength was very high between pH 4.5 and 6.5, except at pH 5.5, where the activity was lower and the ratio U_i/U_{iH} smaller. The characterization of the free enzyme (Hernlasteens & Maugeri, 2008) revealed its dimeric form, so the results presented here were possibly a reflex of this structural feature, strongly affected by the pH, support charge and form of immobilization. The enzyme activity and transfructosylation strength at pH 5.0 and 6.0 were similar, so these values were selected for further biocatalyst

characterizations. Standard deviations for all experimental data were between 0.10 and 0.37.

d) Influence of temperature on biocatalyst activity: the influences of the temperature at pH 4.5 and 6.0 can be seen in Figure 4, showing the difference in slope between enzymatic activation and deactivation. At pH 4.5 the optimum temperature was estimated to be about 62°C, and at pH 6.0 about 64°C. The ratio U_i/U_{iH} indicated that at temperatures between 45 and 65°C the transfructosylation activity (U_i) was higher at both pH values, and for temperatures higher than 65°C this ratio dropped abruptly. The ratio U_i/U_{iH} showed its maximum value at about 65°C at both pH values. Standard deviations for all experimental data were also between 0.10 and 0.48. However, for the free enzyme obtained from the synthetic composition medium GYMP (Hernalsteens & Maugeri, 2008), the optimum temperature range was between 65 and 70°C.

e) Influence of substrate concentration on biocatalyst activity: the influence of the substrate concentration on enzyme activity, as depicted in Figure 5, revealed an inhibitory effect of sucrose at high concentrations (>600 g/L). This behavior is common with enzymes after immobilization, and is due to diffusion limitations and/or proton partition effects (Chang *et al.*, 1997; Tanriseven & Aslan, 2005; Trevan, 1980). The negative charge of the support may attract and concentrate cations as well as positively charged substrate molecules, increasing the concentration of this component in the enzymatic micro-environment. If, in its free form, the enzyme is inhibited by its substrate, after immobilization this effect may be observed at lower concentrations, since the effective concentration is that of the micro-environment and not that of the dispersion medium. Diffusive effects may also occur. These are very common in cases of immobilization by inclusion in polymers, and have also been observed with solid supports covered by enzyme layers (Trevan, 1980).

Kinetic studies with FTase, also using industrial culture media formulations, but in the free, purified and partially purified forms (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010), also revealed an inhibitory effect of sucrose at concentrations above 785 g/L. According to Figure 5, at both pH values, the maximum enzyme activity was at a sucrose concentration of 500 g/L. The ratio U_i/U_{iH} (dotted line) was considerably affected by the sucrose concentration at pH 4.5, whilst at pH 6.0 the ratio remained relatively stable throughout the

range analyzed, indicating that at pH 6.0, the higher sucrose concentrations inhibited the hydrolytic activity. For all the experimental points the standard deviations were again between 0.11 and 0.53.

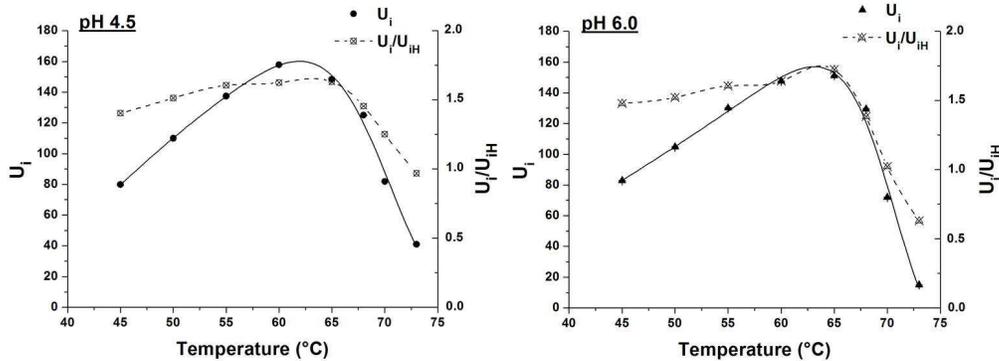


Figure 4: Influence of the temperature at pH 4.5 and 6.0 on the immobilized FTase: biocatalyst U_i (continuous line) and the ratio with hydrolytic activity, U_i/U_{iH} (dotted line).

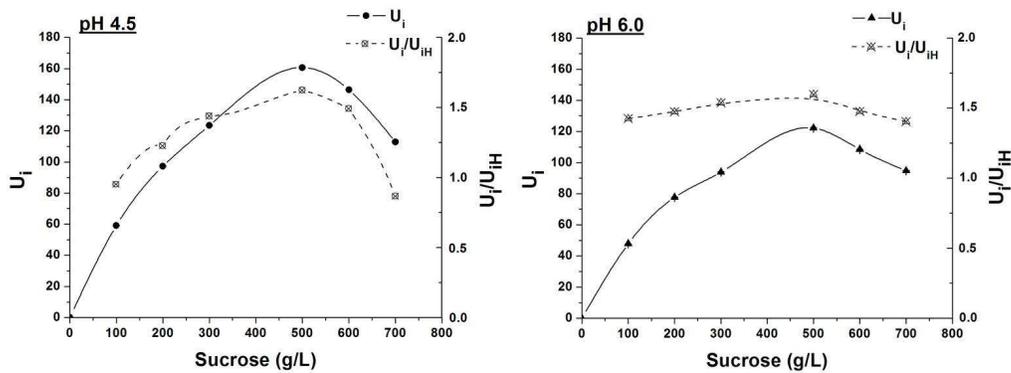


Figure 5: Influence of sucrose concentration on the biocatalyst activity at pH 4.5 and 6.0.

f) *Image analysis:* Figure 6 shows microphotographies of the support surfaces before and after the immobilization procedure, where a slightly smoother surface can be seen (Figure 6.b) after enzyme immobilization, correspondent to the partially purified enzyme adsorbed to the surface. As mentioned before, FTase from *Rhodotorula* sp. is a dimer of about 200 kDa (Hernalsteens & Maugeri, 2008) and the niobium particles have low pore diameter volume (section 2.3), thus, becomes clear by analyzing Figure 6.b that the immobilization occurs only on the surface of the particles and not inside the particles, because of the mismatch in size of the enzyme molecule and the pore particle.

g) Half-life: As 50°C is the standard temperature for FOS synthesis with the free enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008), the stability of the immobilized biocatalyst and of the free enzyme was evaluated at this temperature and also at 48°C in order to validate the data and also according to parallel studies of FOS synthesis optimization (Aguar-Oliveira *et al.*, 2011), this temperature has proved to be a good condition for synthesis with the biocatalyst. The results were satisfactory and confirmed the higher biocatalyst stability at pH 6.0. The half-life ($t_{1/2}$) for the biocatalyst at pH 4.5 was about 24 days at 50°C and 32 days at 48°C; whilst at pH 6.0 these values were about 48 and 72 days, respectively. For the free enzyme at pH 4.5, the $t_{1/2}$ was estimated as 6 and 14 days at 50 and 48°C, respectively.

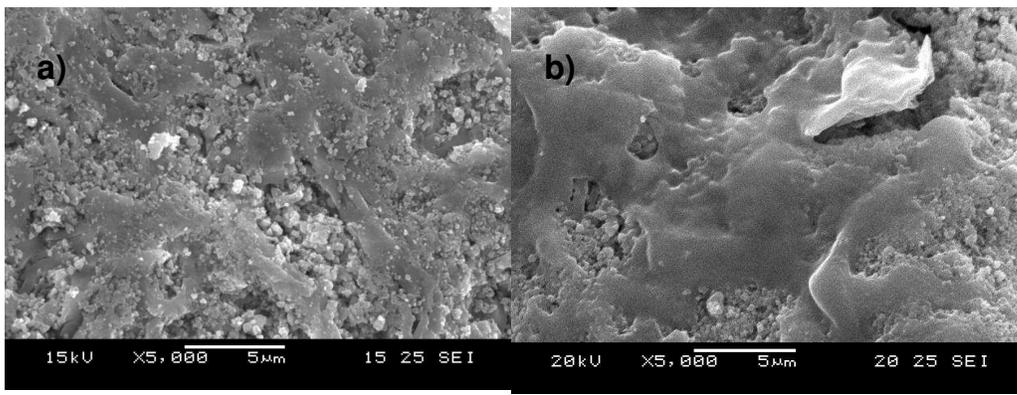


Figure 6: Microphotographs (x 5,000) by SEI showing the particle surface **a)** before (clean particles; superficial porosity) and **b)** after enzyme immobilization (solution of precipitated proteins with transfructosylation activity adsorbed).

In previous work (Aguar-Oliveira, 2007), FTase was immobilized in different supports using different methodologies, for example, in silica grafted with zirconium. In this case, when immobilization was performed by adsorption, a value of 0.8 was obtained for ϵ_{immob} . However, after 72 h under refrigerated conditions (4 - 6°C) the activity fell to 5% of the initial value. In a second attempt, with the enzyme immobilized by covalent bonds, ϵ_{immob} was 0.7, and after 72 h under the above conditions, the activity fell to 35% of the initial value. On account of these experiments, performed under low temperature and short time of storage, no further studies over $t_{1/2}$ were carried out using these two forms of immobilization.

h) FOS synthesis: the sugar concentration profiles obtained with the immobilized enzyme were shown to be very similar to those obtained in previous studies in the author's

laboratory using the same enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008) with the sucrose (GF) being converted in about 24 hours and, as expected, kestose (GF₂) been firstly formed in large quantities, and then gradually transformed to nystose (GF₃) and subsequently to 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄). Table 2 shows the data for the conversion of sucrose into FOS and also its composition, for the conditions described in section 2.7. An increase in biocatalyst load increased the conversion of sucrose into FOS, whilst in previous studies with the free enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008; Maugeri & Hernalsteens, 2007) conversions of 0.50 to 0.63 were obtained. Other studies (Chang *et al.*, 1997; Ghazy *et al.*, 2007) presented similar yields using enzymes from different microbial origins. Our results also showed that after 96 hours of synthesis Y_{FOS} was higher at pH 6.0 (0.59) than at pH 4.5 (0.56). However at the latter pH value, GF₄ reached higher concentrations (0.092), which is an interesting behavior in FOS production. Specific studies on the optimization of the FOS synthesis in stirred batch reactors with the biocatalyst were performed (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011), and pH 6.0 has proven to be a favorable condition for FOS synthesis.

Table 2: Data for the yields from sucrose (Y_{FOS} – Eq.10) and FOS composition (Φ_{GF_{n=2-4}} – Eq.11), with immobilized FTase at 7 and 14 U_i/mL and at pH values of 4.5 and 6.0.

	pH 4.5				pH 6.0			
	7 U _i /mL		14 U _i /mL		7 U _i /mL		14 U _i /mL	
	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
Y _{FOS}	0.44	0.55	0.52	0.56	0.30	0.57	0.52	0.59
Φ _{GF2}	0.78	0.37	0.85	0.35	0.53	0.46	0.94	0.42
Φ _{GF3}	0.20	0.55	0.32	0.58	0.56	0.54	0.20	0.57
Φ _{GF4}	0.020	0.087	0.004	0.092	0.575	0.045	0.044	0.069

4- Conclusions

The immobilization methodology used in this study led to a high biocatalyst stability, which increased with the addition of salts to the reaction medium, particularly CuSO₄, increasing the enzyme half-life up to 1.25 times at 60°C. The influence of pH showed the formation of two peaks of maximum activity, one corresponding to the optimum pH of the free enzyme (pH 4.5). This effect can be explained by the association between the dimeric form of the enzyme and the strong negative charge of the support that

promotes proton partition effects. With respect to the enzyme half-life, at 65°C it was 1.45 times higher at pH 6.0 than at pH 4.5. The effects of the substrate concentration confirmed inhibition of the enzyme activity at high sucrose concentrations of above 600 g/L. Immobilization changed the critical sucrose concentration from 785 g/L with the free and purified enzyme down to 600 g/L with the immobilized and partially purified enzyme, reflecting partition and/or diffusion effects induced by immobilization on a negatively charged support. Good thermal stability was also observed at 50°C, the half-life being about 24 days at pH 4.5 and about 48 days at pH 6.0. However, at 48°C the half-lives jumped to 32 and 72 days, respectively. With respect to the synthesis of FOS from sucrose, the efficiency and profiles were similar to those obtained with the free enzyme. The conversion of sucrose to FOS was slightly higher at pH 6.0 than at pH 4.5, reaching about 0.59 and 0.57, respectively, using 14 U_i/mL of enzyme activity. Despite its well-known limitations (when compared to covalent linkage, for example) immobilization by adsorption, as performed in this study, has provided enough evidences to affirm that this is a promising technique for the application of this biocatalyst in process bioreactors.

5- Acknowledgment

The authors are grateful to FAPESP and CAPES for their financial support; to the Brazilian Company of Metallurgy and Mining (CBMM-Brazil) and the Fluminense Industrial Company (CIF-Brazil) for their kind donation of the niobium used in all the tests and experiments; to the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS-Brazil) where the microphotos were taken, and to the Laboratory of Thermal Analysis (DEQ/UFSCar - Brazil) where the niobium particles were analyzed by BET methodology.

6- Nomenclature

BET	Equation for physical adsorption of gas molecules on a solid surface	GF ₃	Nystose
FOS	Fructooligosaccharides	GF ₄	1 ^F -fructofuranosyl-nystose
F	Fructose (μmol/min)	n	Number of fructosyl groups, degree of polymerization
F _T	Transferred fructose (μmol/min)	Nb	Niobium
FTase	Fructosyltransferase	R	Reducing sugars (μmol/min)
G	Glucose (μmol/min)	R _T ^t	Residual activity after a time “t” at a temperature “T”
[GF ^o]	Initial concentration of sucrose (g/L)		
GF ₂	1-kestose		

RS	Reducing sugars ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	U_{IH}	Immobilized hydrolytic activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
SEI	Secondary electrons technique	U_i^o, U_{TF}^o	Initial enzymatic activities at time zero
SEM	Scanning electron microscope	U_i^t, U_{TF}^t	Enzymatic activities at time "t"
$t_{1/2}$	Half-life (min, days)	Y_{FOS}	FOS Yield [FOS]/[GF°]
U_o	Total enzymatic activity submitted to immobilization	ϵ_{immob}	Efficiency of immobilization
U_{TF}	Transfructosylation activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	ϕGF_n	FOS compositions [GF _n]/[FOS]
U_{H}	Hydrolytic activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		
U_i	Immobilized transfructosylation activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ of support)		

7- References

- Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. Brazil: Faculty of Food Engineering: University of Campinas (UNICAMP); MSc. Dissertation.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(2), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E., Rodrigues, M. I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase**. Current Chemical biology, In the press.
- Alvarado-Huallanco, M.B. (2010) **Modelagem cinética e simulação de processo de produção de frutooligosacarídeos por frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. livre e imobilizada**. Brazil: Faculty of Food Engineering: University of Campinas (UNICAMP), PhD Thesis.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Chen, W. & Liu, C. (1996). **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus***. Enzyme and Microbial Technology, 18 (2), 153-160.
- Chiang, C.J., Lee, W.C., Sheu, D.C. & Duan, K.J. (1997). **Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides**. Biotechnology and Progress, 13, 577-582.
- Ghamgui, H., Miled, N., Karra-Chaâbouni, M. & Gargouri, Y. (2007). **Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO_3 : A comparative study**. Biochemical Engineering Journal, 37, 34-41.
- Ghazy, I., Fernández-Arroyo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A. & Plou, F.J. (2007). **Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus***. Journal of Biotechnology, 128 (1), 204-211.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995). **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of prebiotics**. The Journal of Nutrition, 125 (6), 1401-1412.
- Henry, C.J.K. & Chapman, C. (2002). **The Nutrition Handbook for food processors**. England: Woodhead Publishing Limited.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.
- Hidaka, H., Hirayama, M. & Sumi, N. (1998). **A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611**. Agricultural Biological Chemical, 52 (5), 1181-1187.
- Janolino & Swaisgood in: Bickerstaff, G.F. (1997). **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology 1**. New Jersey: Human Press, pp. 21-26.
- López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Dellamora-Ortiz, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. & Guisán, J.M. (2007). **Stabilization of different alcohol oxidase via immobilization and post immobilization techniques**. Enzyme and Microbial Technology, 40, 278-284.

- Manolov, R.J., Kambourova, M.S. & Emanuilova, E.I. (1993). **Immobilization and properties of *Bacillus stearothermophilus* pullulanase**. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 18, 409-415.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico**. Patent: PI 070683-1, Brazil Office.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49, (1-6), 43-49.
- Maugeri, F., Hernalsteens, S., Barbosa, G.N.O. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Produção de frutooligosacarídeos a partir de sacarose por enzima, imobilizada ou livre, extracelular de leveduras**. Patent: PI 0705359-2, Brazil Office.
- Mendes, G.L. (2006). **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratado**. Brazil: Faculty of Food Engineering: University of Campinas (UNICAMP), MsC. Dissertation.
- Muramatsu, M., Nakakuki, T., Kainuma, S. & Miwa, T. (1994). **Production method of branched fructooligosaccharides**. United States Patent; US:5,334,516, USA.
- Mysore, N.R.R., Shivakumara, M., Sangeetha, P.T., Prapulla, S.G. & Prakash, M. (2005). **Process for preparation of fructooligosaccharides (FOS)**. Patent Application Publication, US2005/0069627 A1, USA.
- Nelson, N. (1944). **A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose**. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- Papinutti, L., Dimitriu, P. & Forchiassin, F. (2008). **Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases**. *Bioresource Technology*, 99, 419-424.
- Park, P.K., Kim, E.Y. & Chu, K.H. (2007). **Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments**. *Separation and Purification Technology*, 53 (2), 148-152.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. & Bruni, R. (2005). **Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods**. *Food Chemistry*, 91 (4), 621-632.
- Sanjay, G. & Sugunan, S. (2006). **Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10**. *Food Chemistry*, 94, 573-579.
- Somogyi, M.A. (1945). **A new reagent for the determination of sugars**. *Journal of Biological Chemistry*, 160, 61-68.
- Tanabe, K. (2003). **Catalytic application of niobium compounds**. *Catalysis Today*, 78, 65-77.
- Tanabe, K., Misono, M., Ono, Y. & Hattori, H. (1989). **Studies in Surface Science and Catalysis: New Solid Acids and Bases their catalytic properties**. Kodansha LTDA, Tokyo 51.
- Tanriseven, A. & Aslan, Y. (2005). **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides**. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 550-554.
- Trean, M.D. (1980). **Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology**. New York: John Wiley & Sons Ltd.
- Wilchek, M. & Miron, T. (2003). **Oriented versus random protein immobilization**. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 55, 67-70.

Effects of the addition of substrate and salts in the immobilization of the fructosyltransferase and on its catalytic properties

Resumo

Conforme resultados apresentados no Capítulo 2 sobre o efeito da adição de sacarose e CuSO_4 ao meio de dispersão da adsorção, avaliou-se o efeito destes compostos sobre a capacidade catalítica da frutossiltransferase (FTase) imobilizada em nióbio em sínteses de FOS. A adsorção conduzida em presença da sacarose resultou em conversões (Y_{FOS}) e composições dos FOS (ϕGF_n) muito semelhantes ao biocatalisador imobilizado padrão, indicando que os sítios ativos não são envolvidos na adsorção. Já os biocatalisadores obtidos em presença de CuSO_4 apresentaram um aumento de 9-12% em Y_{FOS} , mas quando o biocatalisador padrão foi submetido a síntese de FOS em presença deste sal no meio reativo a produção de FOS foi totalmente inibida, indicando que seus íons interagem com a estrutura tridimensional da enzima de forma a provavelmente ocluir ainda mais os sítios ativos, pois em conformidade com os resultados apresentados no Capítulo 2, este sal tem um grande poder estabilizador sobre a enzima imobilizada. Sínteses de FOS realizadas com a enzima imobilizada na forma padrão, mas com adição de MnCl_2 e NaCl ao meio reativo, resultou em diferentes níveis de redução sobre Y_{FOS} e ϕGF_n , portanto, a presença dos íons estudados em sínteses inibe a cinética da FTase imobilizada.

Effects of the addition of substrate and salts in the immobilization of the fructosyltransferase and on its catalytic properties

E. Aguiar-Oliveira & F. Maugeri

ABSTRACT

The partially purified extracellular fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 when adsorbed to niobium particles in presence of 4 and 8% w/v of sucrose (its substrate) did not presented any differentiation in relation to FOS synthesis, meaning that the enzymatic active sites are not related to adsorption. Biocatalysts immobilized in presence of CuSO₄ at 5 and 10 mM presented a gentle increase in FOS yield (9 to 12%) in relation to the standard condition and when FOS synthesis is conducted in presence of 10 mM of this salt, no FOS molecule is produced; this suggest that as this salt is a strong stabilizing agent its interaction with the protein molecule should result in a “safe” conformational structure for the enzymatic active sites which can even obstruct the sites acessibility. FOS syntheses in presence of 10 mM of MnCl₂ or NaCl were also inhibited but, not as much as observed with CuSO₄.

Keywords: CuSO₄, Effect of Salts in Adsorption, Effect of Sucrose in Adsorption, Fructooligosaccharides Synthesis, MnCl₂, NaCl, Niobium

1- Introdução

A enzima frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) extracelular e parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 nas formas livre e imobilizada tem apresentado resultados interessantes quanto a suas características catalíticas (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008). Desde o isolamento da levedura *Rhodotorula* sp. LEB-V10 de flores da Mata Atlântica Brasileira (Maugeri & Hernalsteens, 2007), diversos estudos tem sido conduzidos com sua frutossiltransferase parcialmente purificada (precipitação com etanol) já que a solução protéica assim obtida do meio de cultivo apresenta boa atividade de transfrutossililação e suas características cinéticas e de conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos (FOS) – um açúcar pré-biótico (Maiorano *et al.*, 2008; Sangeetha *et al.*, 2005) – não diferem de forma a justificar a adição de outras etapas de purificação (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010). Desde a caracterização inicial do biocatalisador obtido pela adsorção da frutossiltransferase em nióbio (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), estudos adicionais tem sido conduzidos quanto a sua estabilidade térmica (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011), otimização de sínteses (Aguiar-Oliveira *et al.* 2011), liofilização, aplicação em biorreatores, etc. com o objetivo de se consolidar a aplicação industrial desta enzima.

Cada enzima, como molécula protéica que é, tem sua própria conformação ideal ou satisfatória que permita a realização de uma atividade biocatalítica; para isso o substrato deve ligar-se à enzima em seu sítio, que é uma cavidade com forma definida e aberta na superfície da molécula, constituída por grupos R de aminoácidos que podem ou não estar distanciados entre si na estrutura primária e devido à conformação tridimensional da molécula, apresentam uma proximidade também tridimensional (Borzani *et al.*, 2001). Muitos outros componentes como íons, cofatores, coenzimas ou substratos competitivos (reversíveis), etc. podem se ligar a molécula alterando ou não sua conformação ou limitando o acesso ao sítio ativo, no entanto, sabe-se que o uso destes aditivos ao meio é bastante efetivo para diversas enzimas porque esta “ocupação” do sítio ativo resulta em menores, porém, significantes mudanças conformacionais na cadeia polipeptídica e a enzima adota uma conformação mais rígida (Fágáin, 1997).

A presença de um sal também pode causar efeitos estabilizadores ou desestabilizadores nas proteínas dependendo, por exemplo, da sua posição na série liotrópica de Hofmeister, já que alguns sais são também empregados para precipitação ou dessorção de proteínas (Fágáin, 1997). Algumas enzimas requerem a presença de íons ou outras moléculas em associação para desempenhar sua função biocatalítica ou aumentarem sua estabilidade. Íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} são ativadores comuns (Borzani *et al.*, 2001). Sabe-se que algumas enzimas necessitam de certos sais para realizar determinadas catálises; de acordo com Chaplin and Bucke (1990), alguns sais necessários à boa reatividade de enzimas podem ser ligados ao suporte onde a enzima será imobilizada ou adicionados ao meio de reação. Papinutti *et al.* (2008) observaram um ótimo efeito estabilizador do sal CuSO_4 sobre uma lacase. Ozimek *et al.* (2005) and Hijum *et al.* (2003) observaram com uma inulosucrase (pertencentes ao grupo das frutossiltransferases) geneticamente modificada que o íon Ca^{2+} exerce um importante papel estabilizador e ativador quando adicionado ao meio; a adição de Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} reduzem a atividade enzimática; 1 mM de Mg^{2+} , K^+ e Na^+ não apresentam nenhum efeito significativo mas 1 mM de Ca^{2+} aumenta a atividade enzimática em quase 30%.

A presença de moléculas do substrato durante o processo de imobilização de uma enzima em um suporte (ou seja, durante a formação das ligações químicas responsáveis pela imobilização) pode proteger seus sítios ativos evitando que estes sejam utilizados como pontos de ligação na imobilização (Wilchek & Miron, 2003). Autores como Wilchek and Miron (2003) defendem que a imobilização orientada evita que sítios importantes à atividade biocatalítica sejam inviabilizados estericamente ou utilizados para formação das ligações com o suporte como pode acontecer em casos de imobilização aleatória. Reetz *et al.* (1996) observaram que poderiam aumentar consideravelmente a atividade de uma lipase, quando esta era inclusa em materiais hidrofóbicos sol-gel em presença de aditivos como polietileno glicol, álcool polivinílico e proteínas como albumina ou gelatina e que aditivos com baixo peso molecular como sorbitol, glicerol ou triglicerídeos não apresentam efeito significativo.

Sabe-se que a imobilização sempre afetará de alguma forma a enzima espera-se, entretanto, que esta interferência seja mínima e que não altere a capacidade biocatalítica da enzima. A imobilização permite o uso repetido do biocatalisador ao insolubilizar a enzima e

permitir sua aplicação nos mais diversos tipos de biorreatores, mas restringe a mobilidade da enzima dependendo da força química envolvida na reação. Muitos autores sugerem as mais diversas metodologias de imobilização com o objetivo de reduzir o impacto sobre a enzima.

Em trabalhos anteriores (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010 e 2011), encontram-se informações importantes sobre alternativas para a imobilização da frutossiltransferase em nióbio como imobilização orientada e aleatória e adsorção enzimática em presença de diferentes concentrações de substrato (sacarose) e CuSO_4 , mas o efeito destas metodologias de imobilização sobre a capacidade catalítica da enzima ainda não havia sido avaliada.

2- Materiais e Métodos

Tendo como base, as metodologias descritas e empregadas em trabalhos anteriores (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008), *Rhodotorula* sp. LEB V-10 foi cultivada em meio contendo melão de cana e água de maceração de milho. Sua frutossiltransferase extracelular foi parcialmente purificada por precipitação com etanol, imobilizada por adsorção em nióbio e sua atividade de transfrutossilção (U_i) foi determinada por meio das metodologias de Somogyi-Nelson e kit enzimático Glicose-oxidase. Os padrões cromatográficos dos fruto-oligossacarídeos (GF_2 , GF_3 and GF_4) foram obtidos da Wako Chem. (Japão) e os padrões cromatográficos de sacarose, glicose e frutose foram obtidos de marcas de confiança no mercado.

2.1- Sínteses de FOS

As sínteses de fruto-oligossacarídeos (FOS) foram realizadas com base em trabalhos anteriores (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008). O meio reativo padrão de síntese foi 50 % (p/v) de sacarose comercial em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5 ou pH 6,0. A concentração enzimática empregada foi de 6 U_i/mL e a temperatura foi de 50°C. Sínteses em pH 4,5 e pH 6,0 foram conduzidas com o biocatalisador imobilizado obtido de forma padrão (sem adição de sacarose ou CuSO_4) e corresponderam às condições padrão. Todas as sínteses foram realizadas em duplicata e com volume total de 5 mL em frascos agitados em banho termostatizado.

2.1.a- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de sacarose

A adsorção da frutossiltransferase (FTase) em nióbio (Nb) foi feita em presença de 4 e 8% (p/v) de sacarose adicionada ao meio de dispersão segundo Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) e o biocatalisador imobilizado obtido foi empregado (6 U_i/mL) em sínteses de FOS sob as condições descritas acima.

2.1.b- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de CuSO₄

A adsorção da frutossiltransferase (FTase) em nióbio (Nb) foi feita em presença de 2, 5 e 10 mM de CuSO₄ adicionado ao meio de dispersão de imobilização segundo Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) e o biocatalisador imobilizado obtido (6 U_i/mL) foi empregado em sínteses de FOS sob as condições descritas acima.

2.1.c- Sínteses com adição dos sais: CuSO₄, MnCl₂ e NaCl

O biocatalisador FTase/Nb obtido de forma padrão (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) foi avaliado com relação ao seu desempenho em sínteses de FOS em meio reativo descrito acima contendo os seguintes sais, adicionados isoladamente: CuSO₄, MnCl₂ e NaCl, em uma concentração de 10 mM cada.

2.2- Identificação e quantificação de carboidratos

As amostras (20 µL) foram coletadas ao longo de todas as sínteses acima mencionadas. Os carboidratos provenientes destas sínteses: sacarose (GF), glicose (G), frutose (F), 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) and 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄) foram identificados e quantificados por cromatografia de íons (HPLC-PAD) com base em metodologia definida previamente (Maugeri & Hernalsteens, 2007).

2.3- Eficiência das sínteses

A conversão do substrato (sacarose) em FOS denominada Y_{FOS} foi obtida pela Equação 01 sendo a concentração inicial da sacarose no meio de 500 g/L e [FOS] a concentração total (g/L) dos fruto-oligossacarídeos obtidos num determinado tempo de síntese; a composição percentual de cada FOS obtido também foi calculada com base na concentração (g/L) total de FOS obtido. A produtividade específica de FOS denominada

Pr_{FOS} (mg/U.h) foi calculada conforme Equação 02. A composição percentual de cada FOS foi calculada tendo como base a concentração inicial de sacarose (500 g/L) de acordo com a Equação 03.

$$Y_{FOS} = \frac{[FOS]}{[500 \text{ g / L}]} \quad (01)$$

$$Pr_{FOS} = \frac{[FOS]^{t(h)}}{(U/mL)t(h)} = \frac{mg}{U.h} \quad (02)$$

$$\%GF_n = \left(\frac{[GF_n]}{[500 \text{ g / L}]} \right) * 100\% \quad (03)$$

3- Resultados

Por se tratar de um hetero-dímero (Hernalsteens & Maugeri, 2008) a frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 ao ser imobilizada em nióbio, um suporte sólido-ácido revelou um duplo ponto de atividade enzimática máxima [pH 4,5 e 6,0 como reportado por Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010)]. Sob condições padrão de síntese em pH 4,5 a concentração máxima de FOS foi de 255,85 g/L ($Y_{FOS} = 0,51$) e em pH 6,0 de 274,11 g/L ($Y_{FOS} = 0,55$) ambas com 96 h de tempo de síntese (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011). Diversos relatos na literatura indicam que as conversões da sacarose em FOS obtidas com diferentes frutossiltransferases variam de 24 a 61% e que estes valores raramente ultrapassam 60% de conversão devido a inibição competitiva da glicose sobre os produtos da síntese (Beine, *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2010; Sangeetha *et al.*, 2005).

Estudos cinéticos da frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 apresentam a cinética de produção dos FOS em que inicialmente GF_2 é formado em altas concentrações e depois GF_3 e GF_4 são formados em diferentes proporções (Alvarado-Huallanco & Maugeri, 2010), assim como observado com frutossiltransferase provenientes de outros microorganismos (Maiorano *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2010). Diferentemente, Kim *et al.* (1998) obtiveram com uma frutossiltransferase de *Bacillus macerans* EG-6 uma produção exclusiva de GF_4 após 40 h de síntese sem formação dos precursores: GF_2 and GF_3 .

3.1- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de sacarose

Conforme Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) a adição da sacarose ao meio de dispersão para adsorção da frutossiltransferase em nióbio revelou uma desaceleração na adsorção, especialmente nas 10 primeiras horas; ao final de 18 h de imobilização a condição padrão apresentou uma eficiência de imobilização de 98% e as condições contendo 4 e 8% (p/v) de sacarose apresentaram 94 e 93% de eficiência, respectivamente. Dessa forma, as enzimas imobilizadas obtidas em presença de 4 e 8 % (p/v) de sacarose foram empregadas em sínteses de FOS e comparadas quanto ao seu desempenho com a enzima obtida de forma padrão. A Figura 1 apresenta as conversões da sacarose (Y_{FOS}) e produtividade (Pr_{FOS}) obtidas destas sínteses realizadas sob condições padrão nos pHs 4,5 and 6,0.

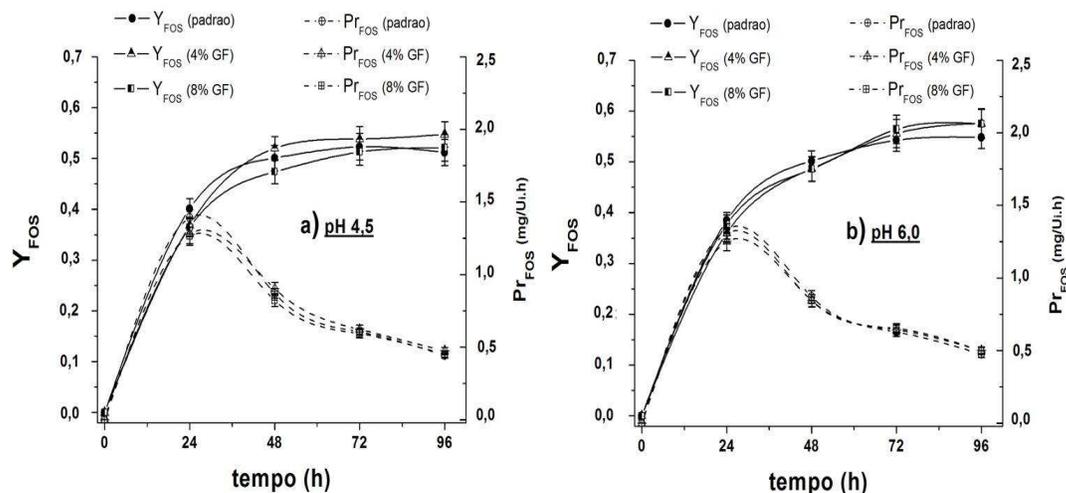


Figura 1: Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas fechados) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio em presença de 4 e 8% (p/v) de sacarose (triângulos e quadrados, respectivamente) e imobilizada de forma padrão (círculos). As sínteses foram realizadas nas condições de: 50°C, 6 U/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: a) 4,5 e b) 6,0.

A Figura 1 revela que praticamente não há diferenças significativas entre as condições avaliadas, inclusive entre os dois valores de pH. Com 72 h de síntese os valores de Y_{FOS} variam em torno de 0,52 e 0,56 e ao final de 96 h entre 0,52 e 0,57; com relação às produtividades específicas de FOS todas as condições apresentaram redução de Pr_{FOS} a

partir de 24 h de síntese e com valores muito semelhantes entre si. As composições percentuais de cada FOS obtido também foram muito semelhantes entre as condições analisadas com valores aproximados de 70% de GF₂, 26% de GF₃ e 4% de GF₄ (dados não apresentados).

Estes resultados mostram que a imobilização da frutossiltransferase em nióbio ocorre sem afetar o sítio ativo da enzima, mesmo na ausência de sacarose, devido provavelmente ao fato de estar o sítio ativo bem protegido no interior da molécula proteica, não sofrendo, portanto, obstrução ou impedimentos estéricos significativos durante o processo de imobilização. Assim, a presença de sacarose durante a imobilização da frutossiltransferase em nióbio se mostra desnecessária.

3.2- Sínteses com biocatalisador FTase/Nb obtido em presença de CuSO₄

Os resultados apresentados em trabalho anterior (Aguiar-Oliveira, 2010) revelaram que a adição de 5 mM do sal CuSO₄ ao meio de dispersão diminuiu a eficiência de imobilização, após 18 h de contato observou-se uma eficiência de imobilização de 88%; com 10 mM do mesmo sal, a eficiência observada foi de 78%; para comparação, a eficiência de um processo padrão é de 98%. Este sal apresentou um grande efeito estabilizador sobre a frutossiltransferase imobilizada (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), por esta razão seu efeito sobre a enzima durante o processo de adsorção foi avaliado e também o efeito disso sobre a capacidade biocatalítica da enzima.

Neste estudo, três concentrações de CuSO₄ no meio de dispersão foram avaliadas: 2, 5 e 10 mM, e os biocatalisadores obtidos foram empregados em sínteses de FOS sob condições padrão. A Figura 2 apresenta os valores da conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) e da produtividade (Pr_{FOS}) obtidos neste estudo ao longo do tempo de síntese.

Em comparação com a condição padrão, para as sínteses realizadas em pH 4,5 os rendimentos (Y_{FOS}) e produtividades específicas (Pr_{FOS}) foram semelhantes entre si (Fig. 2.a), exceto pela condição a 2 mM de CuSO₄ que até 72 h de síntese apresentou rendimentos bem menores, igualando-se às outras condições apenas ao final de 96 h. Em pH 6,0 apenas a condição obtida em presença de 5 mM foi semelhante à condição padrão (Fig. 2.b); por outro lado, o biocatalisador obtido em presença de 10 mM demonstrou

melhores rendimentos entre 24 e 48 h de síntese que a condição padrão (Y_{FOS} 12 e 9% maiores em 24 e 48 h, respectivamente). A síntese realizada em pH 6,0 com o biocatalisador obtido em presença de 2 mM de $CuSO_4$ também apresentou menores rendimentos em comparação com as outras condições, mas com relação a concentração específica de FOS é possível observar que diferentemente de todas as condições avaliadas (Fig. 2) seu valor foi crescente com o tempo, não apresentando um ponto de máximo Pr_{FOS} nas primeiras horas de síntese, o que indica que sua velocidade de produção de FOS foi drasticamente desacelerada.

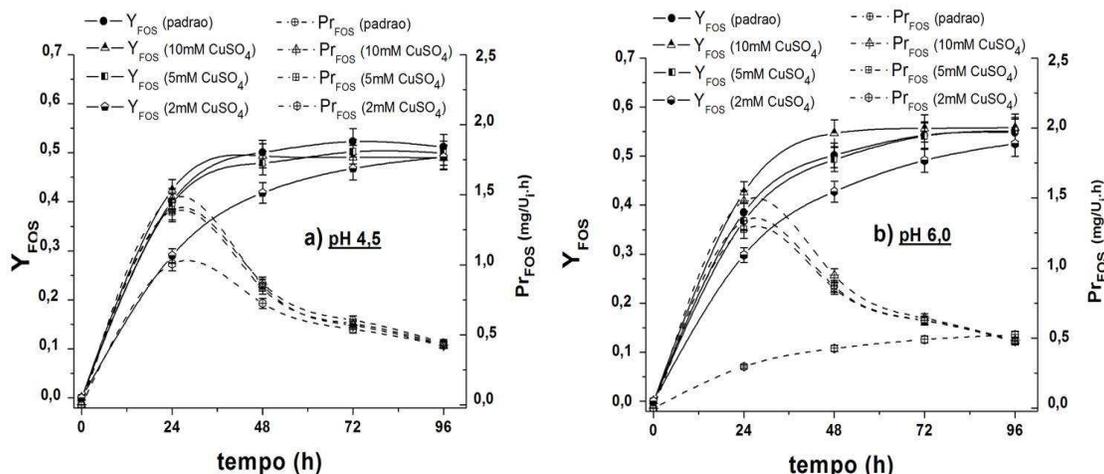


Figura 2: Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas fechados) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio em presença de 2, 5 and 10 mM of $CuSO_4$ (pentágonos, quadrados e triângulos, respectivamente) e imobilizada de forma padrão (círculos). As sínteses foram realizadas sob condições simples: 50°C, 6 U/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: **a)** 4.5 and **b)** 6.0.

A Tabela 1 apresenta as composições percentuais de cada FOS obtido com estas sínteses. Em comparação com a condição padrão, as composições percentuais dos FOS obtidos nas sínteses utilizando a enzima adsorvida em presença de 5 e 10 mM de $CuSO_4$ foram semelhantes entre si, com a enzima adsorvida com 2 mM de $CuSO_4$ as composições percentuais foram menores para GF_2 e GF_3 . Após 96 h, o menor valor de $\%GF_2$ foi obtido em pH 4,5 com o biocatalisador obtido em presença de 10 mM de $CuSO_4$ (0,05% menor

Tabela 1: Composição percentual dos FOS: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄) obtidos de sínteses com frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio com 0 (padrão), 2, 5 e 10 mM de CuSO₄ adicionado ao meio de dispersão da imobilização. As sínteses foram realizadas em 50°C, 6 U/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5 e 6,0. Os desvios padrão variaram entre 7 e 3% dos valores.

	Sínteses em pH 4,5															
	24 h				48 h				72 h				96 h			
	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄
% GF ₂	34,75	26,32	35,77	37,19	40,31	37,19	40,95	41,35	39,42	39,91	39,67	38,24	36,00	39,92	36,94	35,98
% GF ₃	4,37	2,05	3,06	3,65	8,22	3,43	5,53	6,49	10,90	5,30	8,60	8,86	12,81	7,18	10,79	10,50
% GF ₄	0,97	0,66	0,79	1,60	1,56	1,20	1,44	1,53	1,96	1,60	1,93	1,97	2,35	2,02	2,21	2,52
	Sínteses em pH 6,0															
	24 h				48 h				72 h				96 h			
	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄	Padrão	2mM CuSO ₄	5mM CuSO ₄	10mM CuSO ₄
% GF ₂	34,74	27,12	33,23	37,96	42,63	38,04	41,73	45,47	42,50	41,69	42,93	42,26	40,36	42,28	41,58	39,70
% GF ₃	2,89	2,06	2,75	3,79	6,06	3,56	6,25	7,21	9,82	5,77	9,34	10,92	12,22	8,37	11,41	13,17
% GF ₄	0,87	0,66	0,79	0,89	1,47	1,17	1,31	1,99	1,94	1,67	1,82	2,46	2,24	1,99	2,15	2,94

que seu padrão); em pH 6,0 e com o mesmo biocatalisador foram obtidos os maiores valores de %GF₃ and %GF₄ (7 e 24%, respectivamente, maiores que seu padrão). No entanto, a composição percentual de frutose (dados não apresentados) das sínteses empregando o biocatalisador obtido em 10 mM de CuSO₄ foram: 2,4 (pH 4,5) e 1,8 (pH 6,0) vezes maiores que em seus respectivos padrões, o que significa um maior quantidade de frutose não transferida (frutose residual). É provável que concentrações mais elevadas de CuSO₄ promovam um melhor equilíbrio na distribuição de cargas da molécula protéica, levando a uma melhor conformação para o sítio ativo, melhorando a eficiência da síntese.

3.3- Efeito da adição de sais ao meio de síntese

Trabalhos anteriores sobre a caracterização da frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 nas formas livre (Hernalsteens & Maugeri, 2008) e imobilizada em nióbio (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) reportaram que a atividade enzimática livre não foi afetada por MnCl₂ mas houve uma redução de 26-30% com NaCl, ácido cítrico e ZnSO₄ e observou-se um aumento da atividade de 21% com CuSO₄; adicionalmente, com a enzima imobilizada, CuSO₄ aumentou a estabilidade em até 124% em 60°C e com MnCl₂ e NaCl o aumento da estabilidade menor que 75% em 60°C e apresentou efeito negativo em 65°C.

Com o objetivo de se estudar o efeito da presença destes sais no meio de síntese empregando um biocatalisador imobilizado obtido de forma padrão, empregou-se isoladamente os sais CuSO₄, MnCl₂ e NaCl numa concentração de 10 mM na composição dos meios de sínteses. Os resultados relativos a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) e produtividade específica (Pr_{FOS}) provenientes destas sínteses são apresentadas na Figura 3.

A análise da Figura 3 revela que a adição de sais à síntese interfere na conversão da sacarose (Y_{FOS}) e na produtividade (Pr_{FOS}) nos dois pHs avaliados, os resultados foram inferiores em comparação com os padrões. A adição de CuSO₄ foi a de pior impacto sobre as sínteses, em pH 4,5 não houve formação de nenhum FOS e em pH 6,0 apenas a 1-kestose (GF₂) foi formada, resultando numa produtividade específica máxima de 0,06 mg/U_i.h com 24 h; com base neste resultado e no aumento da estabilidade térmica observada especialmente em presença deste sal (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), pode-se afirmar que a estabilidade térmica ocorra devido a algum tipo de alteração conformacional

ou de cargas promovido pela presença de sais como o CuSO_4 , levando a uma oclusão do sítio ativo e consequentemente sua “proteção”.

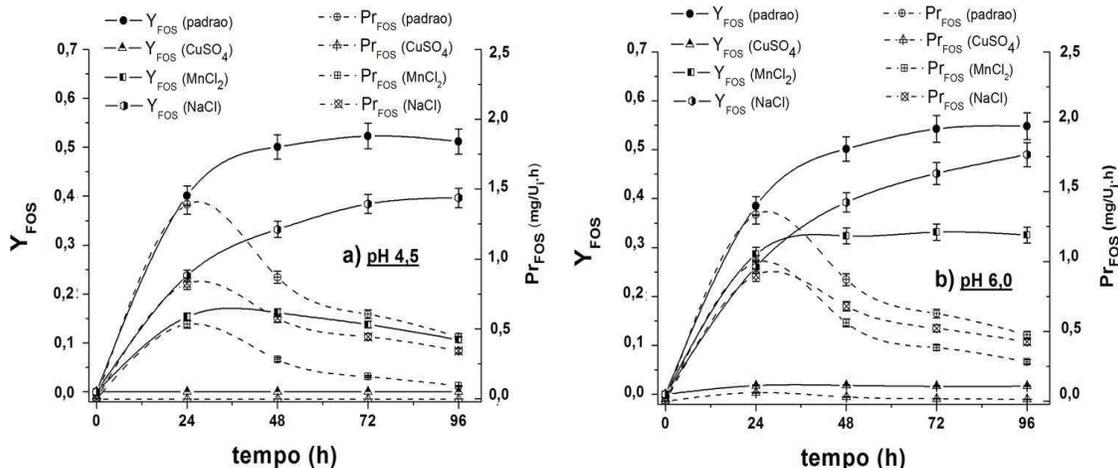


Figura 3: Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS} , Eq. 01; símbolos e linhas cheios) e produtividade específica (Pr_{FOS} ; Eq. 02; símbolos e linhas vazados) com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em nióbio. As sínteses foram realizadas a: 50°C , $6 \text{ U}_i/\text{mL}$, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs: a) 4,5 e b) 6,0. Foram analisados os efeitos da adição individual de 10 mM de CuSO_4 (triângulos), MnCl_2 (quadrados) e NaCl (pentágonos).

As composições percentuais de cada FOS obtido com estas sínteses adicionadas de MnCl_2 e NaCl estão apresentadas na Tabela 2; conforme mencionado, não houve produção de FOS com a adição de CuSO_4 , por essa razão os resultados provenientes desta condição não foram incluídos na Tabela 2. Com relação às sínteses conduzidas em presença de MnCl_2 e NaCl é possível observar da Tabela 2 que as composições percentuais de FOS foram menores que seus padrões, sendo a condição em pH 6,0 e com NaCl a condição mais próxima do padrão.

Uma frutossiltransferase de *Bacillus macerans* EG-7 (Park *et al.*, 1999) que é capaz de produzir exclusivamente o fruto-oligossacarídeo GF_5 costuma apresentar uma fase lag muito extensa (40-60 h) para produção deste FOS a partir da sacarose, no entanto, a adição de íons de amônia, especialmente nitrato de amônia (10 mM) ao meio de síntese conseguiu eliminar esta fase lag. Com esta mesma enzima, íons como Fe^{2+} , Mg^{2+} e K^+ aumentaram, ainda que suavemente, a atividade catalítica. Para uma exoinulinase de *K. marxianus*,

MnSO₄ e CaCl₂ aumentaram sua atividade enzimática e foram fortemente inibidas por HgCl₂ e AgNO₃ (Singh *et al.*, 2007). Outros estudos demonstram que a presença de sais afeta diversas frutossiltransferases, por exemplo, Sangeetha *et al.* (2005) afirma que esta enzima é completamente inibida em presença de 1 mM de Hg²⁺ e Ag⁺.

Tabela 2: Composição percentual dos FOS: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄) obtidos de sínteses com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 imobilizada em nióbio. As sínteses foram realizadas sob condições simples: 50°C, 6 U_i/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,5 e 6,0 adicionadas isoladamente de 10 mM de MnCl₂ e NaCl e sem nenhum aditivo (padrão). Os desvios padrão variaram entre 7 e 3% dos valores.

	Sínteses em pH 4,5											
	24 h			48 h			72 h			96 h		
	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl
% GF ₂	34,75	14,30	22,31	40,31	14,58	31,07	39,42	11,99	35,39	36,00	9,07	35,54
% GF ₃	4,37	1,05	1,44	8,22	1,54	2,13	10,90	1,69	2,95	12,81	1,46	4,04
% GF ₄	0,97	0,01	0,01	1,56	0,08	0,02	1,96	0,11	0,07	2,35	0,13	0,10
	Sínteses em pH 6,0											
	24 h			48 h			72 h			96 h		
	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl	Padrão	MnCl ₂	NaCl
% GF ₂	34,74	27,42	23,84	42,63	30,25	35,27	42,50	29,91	39,63	40,36	28,82	41,63
% GF ₃	2,89	1,18	1,59	6,06	2,21	2,88	9,82	3,20	4,02	12,22	3,71	5,63
% GF ₄	0,87	0,01	0,60	1,47	0,01	1,09	1,94	0,05	1,52	2,24	0,03	1,76

4- Conclusões

Sínteses de fruto-oligossacarídeos (FOS) a partir da sacarose comercial com a frutossiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 tem sido apresentado como um processo capaz de ser aplicado em escala industrial, devido ao baixo custo de obtenção da enzima e eficiência de processo. Os resultados aqui apresentados são importantes e vem acrescentar conhecimentos sobre a enzima e seu desempenho como biocatalisador.

A imobilização em nióbio também tem demonstrado aplicabilidade e vantagens; a adsorção é um procedimento simples e a adição da sacarose como composto protetor do sítio ativo da enzima durante a imobilização não alterou o desempenho do biocatalisador imobilizado, mostrando que o sítio ativo não está diretamente envolvido no processo de

imobilização. No entanto, a presença do sal CuSO_4 a 5 e 10 mM durante a imobilização resultou em biocatalisadores com desempenho (Y_{FOS}) de 12 a 9% maior que a condição padrão entre 24 e 48 h de síntese. A adição de sais conhecidos por elevarem a estabilidade térmica da enzima imobilizada ao meio reativo para síntese de FOS provocou uma inibição considerável do processo catalítico resultando em menor eficiência de síntese, especialmente o sal CuSO_4 .

5- Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

6- Nomenclatura

FTase	Frutosiltransferase	%GF ₂	Composição percentual de GF ₂
FOS	Fruto-oligossacarídeos	%GF ₃	Composição percentual de GF ₃
[FOS]	Concentração de FOS (g/L)	%GF ₄	Composição percentual de GF ₄
GF	Sacarose	Y_{FOS}	Conversão da sacarose em FOS
G	Glicose	Pr_{FOS}	Produtividade específica (mg/ U_i .h)
F	Frutose	U_i	Unidade de atividade enzimática imobilizada de transfrutossilacção ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)
GF ₂	1-kestose	Nb	Nióbio
GF ₃	Nistose		
GF ₄	1 ^F -frutofuranosil-nistose		

7- Referências Bibliográficas

- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (3), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E.; Rodrigues, M.I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase.** Current Chemical Biology, In the Press.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** International Journal of Food Engineering, 6 (3), art. 9, DOI 10.2202/1556-3758.1894.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Beine, R.; Moraru, R.; Nimtz, M.; Na'Amnieh, S.; Pawlowski, A.; Buchholz, K. & Seibel, J. (2008). **Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering.** Journal of Biotechnology, 138, 34-41.
- Borzani, W.; Schimidell, W.; Lima, U.A. & Aquarone, E. (2001). **Biotecnología Industrial: Fundamentos.** Vol. 1, Ed. Edgard Blücher LTDA, São Paulo.
- Chaplin, M.F. & Bucke, C. (1990). **Enzyme Technology.** Cambridge University Press.
- Fágáin, C.Ó. (1997). **Stabilizing Protein Function.** Springer, Ireland.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.

- Hijum, S.A.F.T.; van der Maarel, M.J.E.C. & Dijkhuizen, L. (2003). **Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121**. FEBS Letters, 534, 207-210.
- Kim, B.W.; Choi, J.W. & Yun, J.W. (1998). **Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme**. Biotechnology Letters, 20 (11), 1031-1034.
- Maiorano, A.E.; Piccoli, R.M.; Silva, E.S. & Rodrigues, M.F.A. (2008). **Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pre-biotics**. Biotechnology Letters, 30, 1867-1877, DOI 10.1007/s10529-088-9793-3.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49 (1-6), 43-49.
- Ozimek, L.K.; Euvernik, G.J.W.; van der Maarel, M.J.E.C. & Dijkhuizen, L. (2005). **Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes**. FEBS Letters, 579, 1124-1128.
- Papinutti, L.; Dimitriu, P. & Forchiassin, F. (2008). **Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases**. Bioresource Technology, 99, 419-424.
- Park, J.P.; Bae, J.T. & Yun, J.W. (1999). **Critical effect of ammonium ions on the enzymatic reaction of a novel transfructosylating enzyme for fructooligosaccharide production from sucrose**. Biotechnology Letters, 21, 987-990.
- Prata, M.B.; Mussato, S.I.; Rodrigues, L.R. & Teixeira, J.A. (2010). **Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum***. Biotechnology Letters, 32 837-840, DOI 10.1007/s10529-010-0231-y.
- Reetz, M.T.; Zonta, A. & Simpelkamp, J. (1996). **Efficient Immobilization of Lipases by Entrapment in Hydrophobic Sol-Gel Materials**. Biotechnology and Bioengineering, 49, 527-534.
- Sangeetha, P.T.; Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2005). **Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides**. Trends in Food Science & Technology, 16, 442-457.
- Singh, R.S.; Dhaliwal, R. & Puri, M. (2007). **Partial Purification and Characterization of Exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for Preparation of High-Fructose Syrup**. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17 (5), 733-738.
- Wilchek, M. & Miron, T. (2003). **Oriented versus random protein immobilization**. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 55, 67-70.

Brazilian Journal
of Chemical
Engineering

ISSN 0104-6632
Printed in Brazil
www.abeq.org.br/bjche

Vol. 28, No. 03, pp. 363 - 372, July - September, 2011

THERMAL STABILITY OF THE IMMOBILIZED FRUCTOSYLTRANSFERASE FROM *Rhodotorula* sp.

E. Aguiar-Oliveira* and F. Maugeri

Department of Food Engineering (DEA), Faculty of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP),
Phone: + (55) (19) 3521-4052, Fax: + (55) (19) 3521-4027, R. Monteiro Lobato 80,
Cidade Universitária Zeferino Vaz, Postal Code: 13083-862, Campinas - São Paulo, Brazil.
E-mail: elizamaquiar@yahoo.com.br

(Submitted: August 31, 2010 ; Revised: December 22, 2010 ; Accepted: March 22, 2011)

*To whom correspondence should be addressed

Resumo

Estudos sobre a termoestabilidade da frutossiltransferase (FTase) extracelular e parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em liga de nióbio e grafite revelaram interações importantes entre a enzima e o suporte em consequência dos resultados previamente apresentados no Capítulo 2. A relação de Arrhenius revelou a formação de duas fases distintas com diferentes energias de ativação da desnaturação (E_{ad}) observadas apenas com a enzima imobilizada. Entre as temperaturas de 47 e 51°C a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade térmica, especialmente em pH 6,0, do que a enzima livre, no entanto, entre 52 e 70°C a enzima livre apresenta-se mais estável que a forma imobilizada: em 48°C, $t_{1/2}$ para a enzima imobilizada foi estimada aproximadamente em 32 dias (pH 4,5) e 72 dias (pH 6,0) e para a enzima livre (pH 4,5) 14 dias em 65°C $t_{1/2}$ foi estimada, respectivamente, como 33, 48 e 63 min. Esta diferenciação energética entre 51 e 52°C sugere estar relacionada ao fato de a FTase ser um hetero-dímero que em contato com um sólido-ácido, como o nióbio, pode apresentar diferenciações energéticas e/ou conformacionais neste intervalo de temperatura. Ao analisar o efeito da incubação por 15 min em diferentes temperaturas, mais uma vez a temperatura de 52°C destacou-se, pois, em pH 4,5 a enzima imobilizada apresentou uma ativação da atividade enzimática de 1,8 vezes e em pH 6,0 de 1,6 vezes, a enzima livre foi ativada em 1,2 vezes; em 60°C observou-se também ativação mas apenas com a enzima imobilizada mas com intensidades menores: 1,3 vezes (pH 4,5) e 1,2 vezes (pH 6,0). A temperatura de meia-inativação (T_{50}) foi estimada para a enzima imobilizada como 66°C e 62°C para a enzima livre, ou seja, sob a forma imobilizada a enzima suporta temperaturas mais altas até que perca metade de sua atividade enzimática. Estudos de espectroscopia de fluorescência conduzidos com a inulinase e invertase imobilizadas em nióbio (dados não apresentados ou publicados) revelaram que o nióbio promove o espalhamento da luz impossibilitando o estudo da transição térmica e conformacional também da FTase imobilizada em diferentes temperaturas, seriam necessários estudos mais específicos sobre a conformação enzimática após a imobilização para uma melhor compreensão do efeito do nióbio sobre a FTase.

Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

E. Aguiar-Oliveira & F. Maugeri

Abstract

The thermal stability of the extracellular fructosyltransferase (FTase) from *Rhodotorula* sp., recovered from cultivation medium by ethanol precipitation and immobilized onto niobium-graphite alloy, was studied by Arrhenius plot, half-life profile, half-inactivation temperature (T_{50}) and thermodynamic parameters. The Arrhenius plot showed two different behaviors with different deactivation energies (E_{ad}) only after immobilization, the transition occurring in the temperature interval between 51 and 52°C. T_{50} for free enzyme was estimated around 62°C and after immobilization, 66°C. After 15 minutes at 52°C was also possible to observed an enzymatic activation for both free and immobilized forms, but the greater activation was achieved at pH 4.5 with the immobilized enzyme. Between 47–51°C the immobilized enzyme was more stable than free enzyme, being the pH 6.0 for immobilized enzyme the more stable condition, but above 52°C the free form was more stable.

Keywords: Adsorption, Arrhenius Plot, Dimer, Half-life, Niobium, Thermal Activation.

1- Introduction

Fructooligosaccharides (FOS) belong to the functional class of foods, due mainly to their prebiotic properties (Gibson *et al.*, 2004). FOS can be naturally obtained from fruits, greens and vegetables (Tanriseven & Aslan, 2005) and also from the enzymatic hydrolysis of inulin and/or the transfructosylation of sucrose residues by certain microbial enzymes; the most well-known and most widely applied enzymes in FOS production are those obtained from filamentous fungi and certain bacteria. Nevertheless, yeasts from the genus *Rhodotorula*, isolated from Brazilian Atlantic Forest flowers in the authors' laboratory (Maugeri & Hernalsteens, 2007) are capable of extracellularly producing the dimeric enzyme fructosyltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) which presents high transfructosylation potential (Hernalsteens & Maugeri, 2008).

The immobilization of this enzyme on a solid-acid niobium-graphite alloy has been the subject of several studies, such as: characterization of the immobilized fructosyltransferase (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) studies on the thermostability (presented in the present paper), kinetic studies (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) and the optimization of FOS synthesis in shaking flasks (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011). Initial studies on the characterization of the free enzyme obtained in a synthetic medium (GYMP) showed an optimum pH value of 4.5 (Hernalsteens & Maugeri, 2008). Studies performed with the same enzyme, but obtained using an industrial medium (containing industrial by-products such as corn steep liquor and sugar cane molasses) and immobilized on the same support, showed several effects caused by the strong negative load of the support on the enzyme, such as the existence of two distinct points with maximum activity: pH 4.5 - similar to the free enzyme - and pH 6.0 - presenting excellent thermal stability (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010).

The extracellular frustosyltranferase (FTase) from *Rhodotorula* sp. is obtained by only one purification step (ethanol precipitation – partially purified enzyme) since the transfructosylation activity and degree of purity present in the final concentrate enzymatic solution were adequate for the proposed purpose, allied to the fact that the methodology was of low cost and easy to reproduce in an industrial environment (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008) and also because according to kinetics studies with the

immobilized FTase there is no significant improvement in sucrose conversion between purified and partially purified enzyme (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010).

The industrial application of biocatalysts relies strongly on their stock and operational stabilities. The half-life, which expresses the stock stability, provides information regarding the biocatalytic maintenance capacity between manufacturing time and usage. On the other hand, the operational stability describes enzyme persistence during the process under the conditions of use (Ó'Fágáin, 2003; Papinutti *et al.*, 2008). Immobilization also changes the denaturation profile in both negative and positive ways, one explanation for this being that the decrease in solubility of the enzyme reduces, for instance, molecular and submolecular mobility and vibrations (Bromberg *et al.*, 2008).

The mechanism of enzyme denaturation can show different stages and complexities, the most common models, describing first order kinetics, being those developed by Arrhenius and/or Lumry & Enry (Fogler, 1999; Lumry & Eyring, 1954). However, in some cases, an apparently simple and first order inactivation can mask a set of complex molecular events. It is known that the unfolding of the tertiary structure of the proteins leads to a loss of enzyme functionality, resulting in its denaturation (Ó'Fágáin, 1997). Enzyme thermostability studies provide information on the capacity of the enzyme to resist thermal unfolding in the absence of substrate, and the thermo-affinity studies assess the capacity of the enzyme to perform its function in the presence of the substrate (Nadeem *et al.*, 2007). This work presents the results obtained in the thermal stability studies of immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. due to the great potential and viability for fructooligosaccharides (FOS) production by this enzyme and provides valuable information necessary for bioreactors designs.

2- Material and Methods

2.1- Materials

As related in a previous work (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) the strain of *Rhodotorula* sp. (LEB-V10: Laboratory of Bioprocess Engineering, UNICAMP, Brazil) was isolated from Brazilian Atlantic Forest (Maugeri & Hernalsteen, 2007). The industrial substrates for medium cultivation (by-products): sugar cane molasses and corn steep liquor,

were kindly provided by *The Usina Estér* (Campinas-SP/Brazil) and Corn Products (Mogi Guaçu-SP/Brazil), respectively. The glucose (hydrolytic activity) was determined by using an enzymatic glucose-oxidase kit from LaborLab® (Guarulhos/São Paulo, Brazil). The solid-acid niobium-graphite (~95% Nb) compound, used as the support, was provided by the Brazilian Company of Metallurgy and Mining (CBMM; Brazil). All the other reagents used were acquired from reliable commercial sources.

2.2- *Rhodotorula* sp. cultivation and fructosyltransferase partial purification

The conditions for cultivation of the *Rhodotorula* sp. and partial purification of the fructosyltransferase (FTase) from the medium (by precipitation with anhydrous ethanol) were described previously (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010). The concentrated enzymatic solution with high transfructosylation activity used in all experiments corresponds to the precipitate obtained after precipitation with ethanol re-suspended in a 50 mM acetate buffer, pH 4.5.

2.3- Inorganic support and enzyme immobilization

Particles of the solid-acid niobium-graphite compound between 65 and 80 mesh (180 – 212 μm) were obtained and cleaned according methodology described in a previous work (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) which contains more information about mechanical and chemical properties of these particles.

The standard methodology for immobilization by adsorption onto niobium particles applied in this work was described earlier (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2007).

2.4- The enzymatic activity and related parameters

As applied and described earlier (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008), the enzymatic activity for fructosyltransferase (FTase) was determined based on the methods of Hidaka, Hirayama and Sumi (Hidaka *et al.*, 1998) and Chen and Liu (Chen & Liu, 1996). One transfructosylation activity unit (U_{TF} ; free enzyme; Equation 1) was defined as 1 μmol of fructose transferred (F_T) in one minute (min) and one immobilized activity unit (U_i) expressed one transfructosylation activity unit immobilized in one gram (g) of support (Equation 2).

$$U_{TF} = F_T = [\mu\text{mol}/\text{min}] \quad (01)$$

$$U_i = U_{TF}/g = [\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}] \quad (02)$$

The efficiency of immobilization (ϵ_{immob}) expressed the ratio between the enzymatic activity effectively immobilized (U_i) and total enzymatic activity submitted to immobilization (U_o), as shown in Equation 3; by definition, U_o corresponds to the ratio between the enzymatic activity of the concentrated solution (U_{TF}) submitted to immobilization and the weight of the support (g). The residual activity throughout the time (R_T^t) was determined according to Equation 4 to monitor enzymatic activity losses with time for both the immobilized and free enzymes. For this purpose, some definitions were provided: U_i^o and U_{TF}^o corresponding to the initial enzymatic activities determined at time zero (t_o), and U_i^t and U_{TF}^t corresponding to the initial enzymatic activities determined at time t.

$$\epsilon_{\text{immob}} = \frac{U_i}{U_o} \quad (03)$$

$$R_{T(^{\circ}\text{C})}^{t(\text{min})} = \frac{U_i^t}{U_i^o} \Leftrightarrow \frac{U_{TF}^t}{U_{TF}^o} \quad (04)$$

2.5- Effects of temperature

The thermostabilities of the free and immobilized fructosyltransferase, were followed and established from their residual activities ($R_{T(^{\circ}\text{C})}^{t(\text{min})}$) in stocks maintained in 50 mM acetate buffers at pH values of 4.5 and 6.0 [in accordance to Hernalsteens and Maugeri (2008) for the free form and Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010) for the immobilized form] in the absence of substrate, for various periods of time at temperatures ranging from 47 to 70°C. All the experiments were performed in triplicate.

Half-inactivation temperature (T_{50}) and thermal activation of free and immobilized enzyme were determined by submitting them to a brief incubation period (in 50 mM acetate buffer without substrate) at different temperatures (ranging from 47 to 70°C) for 15 min and then immersed in ice bath for 5 min and finally enzymatic activities were determined according to 2.4. The enzymatic activity obtained after this procedure corresponds to

U_i^{15min} , for the immobilized enzyme, and U_{TF}^{15min} , for the free enzyme. As a control, the enzymatic activities either of free and immobilized enzyme, with no incubation, were determined according to 2.4, which correspond to the value of U_{TF}^o and U_i^o , respectively. These enzymatic activities were applied to Equation 4 in order to obtain the residual activity as a function of the incubation temperature [(R_T^{15min}) versus T (°C)]. For the immobilized enzyme, assays were carried out at pH 4.5 and 6.0 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), while for the free enzyme assays were performed only at its optimum pH value 4.5. All experiments were performed in triplicate.

2.6- General enzyme thermal stability parameters

a) k_d : The enzyme denaturation constant (k_d ; 1/min) was obtained from the graph of $\ln(R_T^t)$ versus time (min) (data not presented), corresponding to the value of the inclination of the regression obtained. For this calculation, only regressions obtained with a minimum of 5 points and with a value for R^2 above 0.93 were accepted.

b) E_{ad} and $t_{1/2}$: The denaturation activation energy (E_{ad} ; kJ/mol) and half-life ($t_{1/2}$; min) of the immobilized enzyme were obtained from the k_d values (Catana *et al.*, 2007; Cornish-Bowden, 1995). According to Arrhenius equation (Equation 5), the k_d values obtained were plotted as $[-\ln(k_d)]$ versus $[10^3/T; (1/K)]$. The value referred to as E_{ad} is obtained by multiplying the ideal gas constant ($R = 8.314 \cdot 10^{-3}$ kJ/mol·K) by the slope of the regression obtained.

$$k_d = A_d \left[e^{-E_{ad}/RT} \right] \Rightarrow -\ln(k_d) = \left(\frac{E_{ad}}{R} \right) \frac{1}{T} - \ln(A_d) \quad (05)$$

The k_d values, if applied to Equation 6, allow for the calculation of $t_{1/2}$ (min), and this equation combined with equation 5 allows one to express $t_{1/2}$ according to Equation 7.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k_d} = \frac{0,6931}{k_d} \quad (06)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,6931}{A_d} \cdot e^{(E_{ad}/RT)} \quad (07)$$

c) T_{50} and thermal activation: Based on Equation 4, the residual free and immobilized activities for each temperature assessed were used to construct the graph of

$R_{T(^{\circ}C)}^{15\text{min}}$ (residual activity after 15 min) versus T ($^{\circ}C$). The value for the half-inactivation temperature (T_{50}) was determined with the support of the mathematical software TableCurveTM 2D (SPSS, INC., 1996) by means of an adjustment of the points to a mathematical equation that allows for the calculation of the temperature required for $R_{T(^{\circ}C)}^{15\text{min}} = 0.5$. The values obtained for $R_{T(^{\circ}C)}^{15\text{min}}$ also provided information on the thermal activation of the enzyme at specific temperatures.

d) The effect of pre-incubation at 52 and 60°C: The temperatures of 52 and 60°C, corresponding to the points of maximum activation observed in the study on T_{50} , were evaluated separately with respect to the intensity of the effect of this activation on enzyme stability. The immobilized enzyme (at pH values of 4.5 and 6.0) and the free enzyme (at pH 4.5) obtained under standard conditions and with initial activities of U_i^o and U_{TF}^o were first submitted to a short incubation at 52 or 60°C for 15 min, and then immersed in an ice bath for 2 min before incubating at 65°C (high temperature) for 35 min, presenting final activities of $U_i^{15-35\text{min}}$ and $U_{TF}^{15-35\text{min}}$. The residual activity obtained in each case, $R_{52-65^{\circ}C}^{*15-35\text{min}}$ and $R_{60-65^{\circ}C}^{*15-35\text{min}}$, was compared with the residual activity obtained after incubation at only 65°C for 35 min, $R_{65^{\circ}C}^{35\text{min}}$. The experiments were carried out in triplicate.

2.7- Thermodynamic Parameters of Enzyme Denaturation

The values for k_d and E_{ad} , obtained, according to sub-items 2.6.a and 2.6.b, were used in the calculations of: Gibbs Free Energy (ΔG ; kJ/mol; Equation 8), Enthalpy (ΔH ; kJ/mol; Equation 9) and Entropy (ΔS ; J/mol.K; Equation 10). For these calculations, the Boltzman constant (k_B) was defined as $1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K and the Planck constant (h) as $11,04 \cdot 10^{-36}$ J.min (Doran, 2002; Blanch & Clark, 1997).

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{k_d \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (08)$$

$$\Delta H = E_{ad} - RT \quad (09)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (10)$$

3- Results and Discussion

3.1- Calculations of E_{ad} (Arrhenius plot)

a) *Free Enzyme*: According to Figure 1 the linear regression of the points in the temperature range assessed (47-70°C) was well fitted ($R^2 = 0.992$), the value for the denaturation activation energy (E_{ad}) was calculated as 294.35 kJ/mol. The R^2 values for the residual activity (Equation 4) ranged from 0.93 to 0.97.

b) *Immobilized Enzyme*: Analyzing Figure 1, two distinct inclination phases can be clearly noted at the two pH values evaluated. The differentiation between the phases occurred in an interval of just 1°C, between 51 and 52°C. The first phase corresponded to the milder temperature range, from 47 to 51°C, and the second phase comprised the temperatures from 52 to 70°C. In the first phase, the linear adjustments obtained gave (E_{ad}) values of 175.10 kJ/mol ($R^2 = 0.976$) at pH 4.5 and 263.16 kJ/mol ($R^2 = 0.952$) at pH 6.0; in the second phase (E_{ad}) was calculated as 293.74 kJ/mol ($R^2 = 0.995$) at pH 4.5 and 319.44 kJ/mol ($R^2 = 0.996$) at pH 6.0. The R^2 values for the residual activity (Equation 4) ranged from 0.93 to 0.96.

When compared to the free enzyme, the immobilized enzyme presented unusual behavior, since a single inclination profile is more commonly observed, as in the case of the free enzyme (Bhatti *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007). However, unusual profiles have previously been reported for the Arrhenius plot, and even a “zig-zag” like profile with two negative inclinations and one positive inclination has been reported (Šikšnis *et al.*, 1990).

The denaturation activation energy (E_{ad}) values for enzymes generally vary from 170 to 400 kJ/mol (Doran, 2002) and this parameter expresses how much energy is needed to promote enzyme denaturation under the conditions assessed. The E_{ad} values obtained shows that at pH 4.5, the free and the immobilized fructosyltransferase (in temperature phase 2) presented very similar energy values. With respect to the immobilized enzyme, the value for E_{ad} was higher in temperature phase 2 (52-70°C) for both the pH values assessed. Several authors have proved that chemical modifications of the surface can drastically change enzyme behavior with respect to its thermostability and other aspects of interest, due to conformational changes (Bhatti *et al.*, 2007; Bromberg *et al.*, 2008; Šikšnis *et al.*, 1990). It

must be emphasized that immobilization, especially on a strongly loaded support such as niobium, can alter the enzyme behavior or highlight imperceptible phenomena when the enzyme is dispersed in the medium (Sadana, 1998).

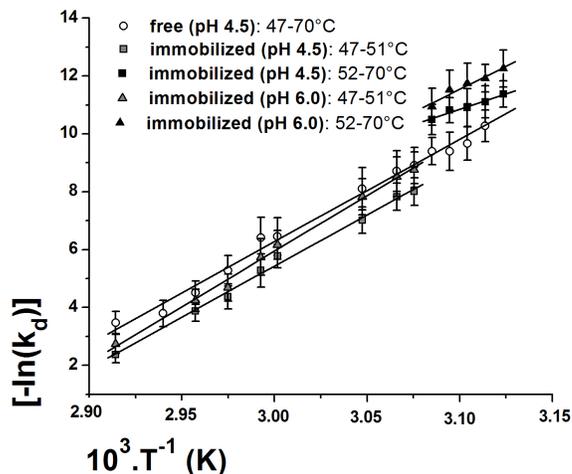


Figure 1: Calculation of E_{ad} for the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the forms: free (pH 4.5) – white circles [linear fit: $y = 35.404.x - 99.936$; $R^2 = 0.992$]; immobilized (pH 4.5) phase 1 – black squares [linear fit: $y = 35.331.x - 100.56$; $R^2 = 0.995$] and phase 2 – gray squares [linear fit: $y = 21.181.x - 54.807$; $R^2 = 0.976$]; immobilized (pH 6.0) phase 1 – black triangles [linear fit: $y = 38.422.x - 86.582$; $R^2 = 0.996$] and phase 2 – gray triangles [linear fit: $y = 31.653.x - 86.582$; $R^2 = 0.952$].

The profiles presented here can also be analyzed considering the dimeric form presented by this enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008) which, according to some authors, is the most common form presented by all fructosyltransferases (Lüscher *et al.*, 1996) and it is also possible to find references to the action of two distinct fructosyltransferases (Nemukula *et al.*, 2009). Between 51 and 52°C some type of energy differentiation occurs with the immobilized enzyme, and to understand this phenomenon one must consider the influence of the support and, maybe principally, the form in which the enzyme is immobilized on the support. Some authors defend the idea that in the case of dimeric enzymes, for example, immobilization can occur with just one of the sub-units, leaving the other one free, and this could alter many aspects of enzymatic functionality (Trevan, 1980). In a study carried out with a trimeric enzyme (Bolivar *et al.*, 2009), a strong argument in favor of the partial immobilization of sub-units was found, such that the dissociation of these sub-units could,

in many cases, be the first step in the inactivation of polymeric enzymes, or the desorption of one of the non-immobilized sub-units could occur, contaminating the reactive medium. One can even conjecture that when incubated at higher temperatures, the molecule of fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. immobilized on niobium could be in the form of two monomers, and in this case would probably require more energy to denature these two independent units. On the other hand, at lower temperatures, the dimeric form would confer greater stability, requiring a lower value for E_{ad} .

3.2- Calculation of $t_{1/2}$

Mathematical expressions for the half-life ($t_{1/2}$) at different temperatures were then obtained according to Equation 7 and are listed below - Equations from 11 to 15. With the help of the software Statistica 5.0 (STATSOFT, INC., 2000), the equations were fitted to the experimental points in order to obtain their respective R^2 values.

a) free FTase (pH 4.5) / 47-70°C – $R^2 = 0.992$:

$$t_{1/2} = 6.935 \cdot 10^{-3} e^{35.404/T} \quad (11)$$

b) immobilized FTase (pH 4.5) 47-51°C – $R^2 = 0.976$:

$$t_{1/2} = 1.265 \cdot 10^{-2} e^{21.181/T} \quad (12)$$

c) immobilized FTase (pH 4.5) 52-70°C – $R^2 = 0.995$:

$$t_{1/2} = 6.892 \cdot 10^{-3} e^{35.331/T} \quad (13)$$

d) immobilized FTase (pH 6.0) 47-51°C – $R^2 = 0.953$:

$$t_{1/2} = 8.005 \cdot 10^{-3} e^{31.653/T} \quad (14)$$

e) immobilized FTase (pH 6.0) 52-70°C – $R^2 = 0.995$:

$$t_{1/2} = 6.340 \cdot 10^{-3} e^{38.422/T} \quad (15)$$

As discussed before, for the free enzyme the profile is exponential and uninterrupted and obeys only to Equation 11. However, for the immobilized enzyme at both pH (4.5 and 6.0) the differentiation between the profiles is clear in both temperature phases (Figure 2). At 50°C, corresponding to the optimum temperature for FOS synthesis with the free enzyme (Hernalsteens & Maugeri, 2008), the half-life ($t_{1/2}$) calculated for the free enzyme

was 5.81 days. After immobilization, this value increased to approximately 24 days at pH 4.5 and nearly twice this value at pH 6.0. Therefore, immobilization was beneficial to the enzyme between 47 and 51°C, increasing its stability (Figure 2). This characteristic makes use of the immobilized fructosyltransferase very promising, because if equations 13 and 15 were followed at temperatures below 51°C, the values estimated for the half-life of the immobilized enzyme at pH 4.5 and 6.0 would be greater than 3 and 7 days, respectively. At 48°C and pH 6.0, corresponding to the optimized temperature and pH for FOS synthesis with the immobilized fructosyltransferase (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011), the half-life obtained experimentally is 72 days and estimated according to equation 14 is 77 days: for free enzyme at 48°C this value would be 14 days - experimental data and according to Equation 11.

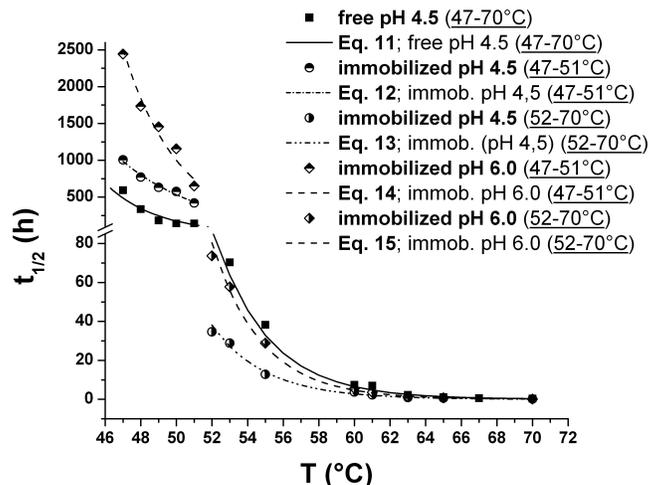


Figure 2: Experimental data (symbols) and estimate according to the model (lines) for the half-life ($t_{1/2}$) of the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free form at pH 4.5 (represented by squares and uninterrupted lines) and immobilized at: pH 4.5 (represented by circles and dotted lines) and pH 6.0 (represented by diamonds and dotted lines).

3.3- Thermodynamic Denaturation Parameters

Protein unfolding is followed by the rupture of several links, generating a disorganized system. This increase in Entropy (ΔS ; J/mol.K) is compensated by a decrease in Gibbs Free Energy (ΔG ; kJ/mol) making it easier for denaturation to occur, meaning that,

when susceptibility to denaturation is higher, the enzyme is in a less energetic state and in greater disorder, since its original structure has been destroyed.

The results for Gibbs Free Energy (ΔG ; kJ/mol) indicate that at the temperatures of the first phase (47-51°C) the immobilized enzyme shows (Figure 3) a more stable intrinsic conformational form, since the values are higher, also indicating that this range is less favorable for protein unfolding. At temperatures above 52°C, Gibbs energy reached completely different levels (Figure 3). This difference between the temperature ranges can also be seen from the values for Enthalpy (ΔH ; kJ/mol) and Entropy (ΔS ; J/mol.K), which indicate that the susceptibility of the enzyme to thermal denaturation increases with increase in temperature (Bromberg *et al.*, 2008).

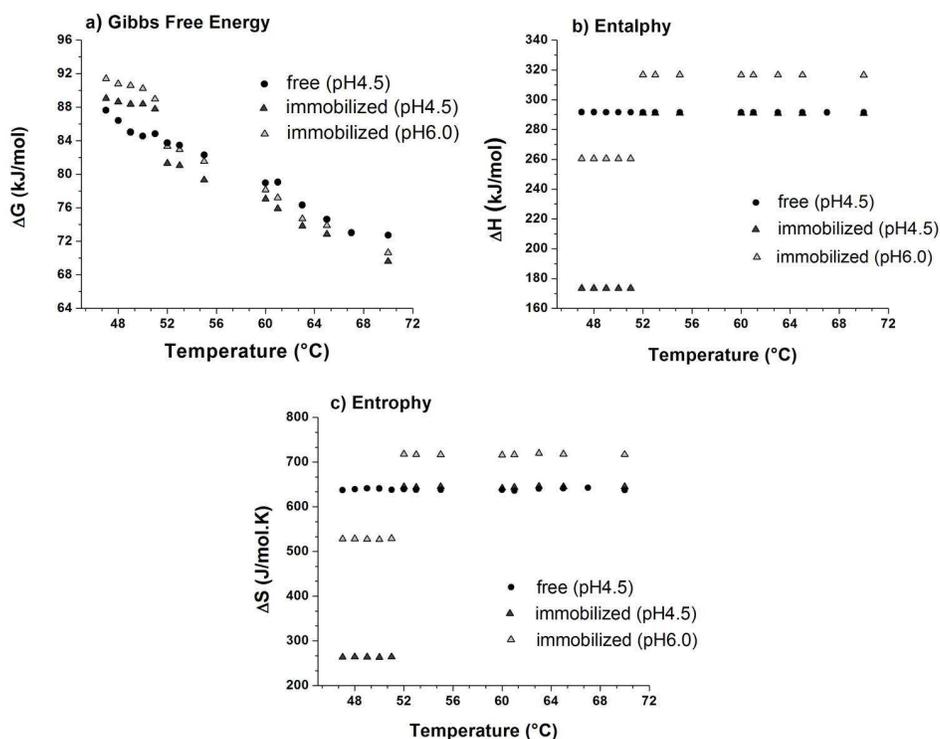


Figure 3: Thermodynamic parameters for the denaturation of the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free (black circles) and immobilized at pH 4.5 (dark grey triangles) and at pH 6.0 (light grey triangles): **a)** Gibbs free energy (ΔG); **b)** Enthalpy (ΔH); **c)** Entropy (ΔS).

According to some authors, one can apply the concept of $\Delta C_p = 0$ to the thermodynamic analyses of enzyme denaturation processes, leading to the conclusion that

ΔH and ΔS are independent of the temperature, as observed in Figure 3 (Doran, 2002; Blanch & Clark, 1997). However, for other authors this simplification represents a simpleton vision of the phenomenon, and they defend marked temperature-dependence (Becktel & Schellman, 1987). The present authors believe that the results and discussions presented in this paper have attended the proposed objective, which was to provide basic knowledge on the heat denaturation phenomenon of immobilized FTase.

3.4- T₅₀ and thermal activation

The mean transition point for thermal protein unfolding can be described as the half-inactivation temperature or unfolding temperature (T_{50}). This parameter corresponds to the temperature where the residual activity (Equation 4) drops to 50% of its initial value after a brief period of incubation, such as 10 (Ruth *et al.*, 2007) or 15 min (Ó'Fágáin, 1997). The basic profile for this type of analysis would be of a sigmoid type, where, as from a certain temperature, the activity decreases significantly, indicating that a brief incubation is sufficient to affect thermal stability of the enzyme. This analysis also makes it possible to confirm the effects of thermal activation (Papinutti *et al.*, 2008). The values obtained for $R_{T(^{\circ}C)}^{15min}$ are shown in Figure 4.

According to the results, one can identify a moderate activation range for the free enzyme between 51 and 57°C, not exceeding 8% of the initial activity. When analyzing the immobilized enzyme, one can distinguish two temperature ranges where enzyme activation was significant at both pH values, these being 57-61°C and 51-53°C. Comparing pH 4.5 with pH 6.0 (this one showing greater stability than that one), the effect of activation on the immobilized enzyme was always higher at pH 4.5, which is equivalent to the optimum pH of the free enzyme. The maximum activation point was observed at a temperature of 52°C, where the value for $R_{52^{\circ}C}^{15min}$ reached $1.82 \pm 2.2 \cdot 10^{-2}$ at pH 4.5 and $1.56 \pm 2.1 \cdot 10^{-2}$ at pH 6.0. As previously discussed in item 3.1, the temperature range between 51 and 52°C suggests some type of energetic and/or conformational limit for the immobilized enzyme, indicating a strong effect of the support.

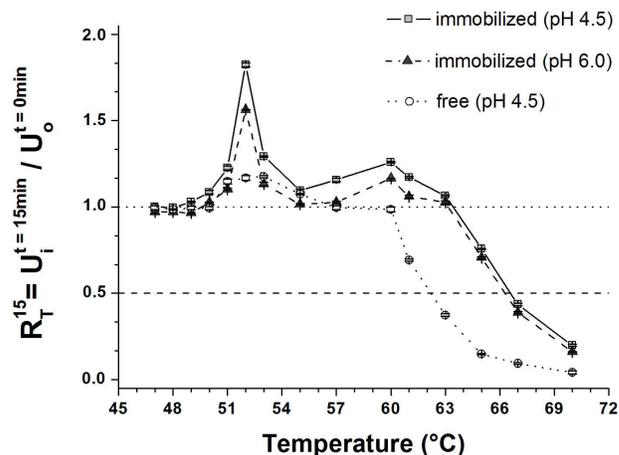


Figure 4: Thermal activation profile after 15 min of incubation at different temperatures and the estimation of half-inactivation temperature (T_{50}) for the partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in the free form (white circles and dotted line) and immobilized form at pH 4.5 (grey squares and full line) and at pH 6.0 (black triangles and dashed line). The light dotted line parallel ($R_T^{15}=1.0$) is a reference for the standard condition, without previous incubation; the dashed line parallel ($R_T^{15}=0.50$) indicates T_{50} .

When the free enzyme was at pH 4.5, there was a pronounced activity loss as from 61°C, the T_{50} of the free enzyme being calculated as 62.06°C. For the immobilized enzyme, the negative effect of incubation became evident at temperatures above 65°C, the T_{50} being estimated as 66.57°C at pH 4.5 and 66.21°C at pH 6.0. However, according to the discussion presented in item 3.1, immobilization was observed to affect enzyme thermostability, at least in the temperature range from 52-70°C. Nevertheless, Figure 4 shows that at temperatures above 63-65°C, the effect of a brief incubation is greater for the free enzyme. Possible explanations for this could be the existence of some type of mild activation caused by the support, even at high temperatures, or maybe some type of protection caused by immobilization.

For some enzymes a pre-incubation step increases stability and is frequently recommended (Papinutti *et al.*, 2008). The present study on the influence of pre-incubating the free and immobilized fructosyltransferase at the temperatures of greatest thermal activation showed that neither of the temperatures evaluated (52 and 60°C) increased thermal stability, free or immobilized, at a higher temperature (65°C), as can be seen from the values for

residual activity in Table 01. With pre-incubation at both temperatures, the free residual activity was about 70% lower than without pre-incubation. For the immobilized enzyme, pre-incubation at 52°C gave a reduction of 17% as compared to the residual value without incubation, and of 35% at 60°C. At pH 6.0, the immobilized enzyme showed the worst effects, with a reduction of approximately 65% at both temperatures evaluated.

Table 1: The effect of pre-incubation at 52 or 60 °C on the thermal stability of free (pH 4.5) and immobilized (pH 4.5 and 6.0) partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. expressed as a function of the residual activity (Eq. 4) with (R_{T-65}^{*15-35}) and without (R_{65}^{35}) the pre-incubation step.

	Free (pH 4.5)	Immobilized (pH 4.5)	Immobilized (pH 6.0)
R_{65}^{35}	0.680 ± 0.003	0.485 ± 0.002	0.606 ± 0.003
R_{52-65}^{*15-35}	0.209 ± 0.003	0.400 ± 0.018	0.210 ± 0.007
R_{60-65}^{*15-35}	0.200 ± 0.001	0.316 ± 0.020	0.217 ± 0.002

4- Conclusions

With respect to the thermostability of the extracellular fructosyltransferase (FTase) from *Rhodotorula* sp. (LEB-V10: Laboratory of Bioprocess Engineering, UNICAMP, Brazil), it can be concluded that the immobilization by adsorption on niobium-graphite alloy (a solid-acid compound) significantly improved the thermal enzymatic stability, especially at temperatures lower than 51°C and at pH 6.0, a value more basic than the optimum condition for the free enzyme (pH 4.5). The results presented so far indicate that the support (niobium) and the immobilization technique (adsorption) can affect in different ways each one of the subunits of immobilized fructosyltransferase, or both at the same time, by showing two distinct optimum pH conditions and also highlighting the effect of the specific temperature of 52°C on thermal stability as observed by the energetic differentiation between 51 and 52°C and additionally the enzymatic activation observed after a pre-incubation, especially at pH 4.5 with the immobilized enzyme. How and what parts of the subunit(s) are involved in the adsorption of the molecule are important knowledge needed for full understanding of all enzymatic behavior observed only after

immobilization. The most plausible explanation for these differences such as between free and immobilized enzyme, presented in this paper, is the effect of the support on the enzymatic micro-environment. We believe it is possible that the subunits dissociate and remain immobilized and it is also possible that the molecular conformation modifies in order to adapt to the changes on macro-environment, like pH or temperature changes. Several authors like Dosztányi *et al.* (1997) has studied over the yeas how to predict or locate the specific sites on protein structure that define their behavior and stability, therefore, sequential studies about the molecular conformation of free and immobilized fructosyltransferase are crucial in order to complete and explain the results here presented in this paper which are the first results about thermal stability obtained with the extracellular fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. immobilized – so far - on niobium and represent [together with our first publication: Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010)] the beginning of a sequential series of studies related to this enzyme and its biotechnological application.

5- Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP and CAPES for their financial support; to the Brazilian Company of Metallurgy and Mining (CBMM-Brazil) for their kind donation of the niobium used in all the tests and experiments and to Professors A. Converti (Genoa-Italy) and C. Ó. Fágáin (Dublin-Ireland) for their important suggestions.

6- Nomenclature

E_{ad}	Denaturation activation energy (kJ/mol)	U_i	Immobilized activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)
F_T	Fructose transferred (μmol)	U_{TF}	Transfructosylation activity unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
FTase	Fructosyltransferase	R'_T	Residual activity at temperature “T (°C)” and time “t (min)”
FOS	Fructooligosaccharides	U_i^o, U_{TF}^o	Initial enzymatic activities at time zero (t_0)
k_B	Boltzman constant (J/K)	U_i^t, U_{TF}^t	Initial enzymatic activities at time “t (min)”
k_d	Denaturation constant (1/min)	ΔG	Gibbs Free Energy (kJ/mol)
h	Planck constant (J.min)	ΔH	Enthalpy (kJ/mol)
R	Ideal gas constant (kJ/mol.K)		
$t_{1/2}$	Half-life (min, days)		
T_{50}	Half-inactivation temperature (°C)		
U_o	Enzymatic activity submitted to immobilization ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		

ΔS Entropy (J/mol.K)

ϵ_{immob} Efficiency of immobilization

7- References

- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.**. International Journal of Food Engineering, 6 (3) DOI 10.2202/1556-3758.1894.
- Aguiar-Oliveira, E.; Rodrigues, M.I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase**. Current Chemical Biology, In the press.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Becktel, W. & Schellman, J.A. (1987). **Protein Stability Curves**. Biopolymers, 26, 1859-1877.
- Bhatti, H.N., Rashid, M.H., Asgher, M., Nawaz, R., *et al.* (2007). **Chemical modification results in hyperactivation and thermostabilization of *Fusarium solani* glucoamylase**. Canadian Journal of Microbiology, 53, 177-185.
- Blanch, H.W. & Clark, D.S. (1997). **Biochemical Engineering**. Marcel Dekker, New York.
- Bolivar, J.M., Mateo, C., Rocha-Martin, J., Cava, F., *et al.* (2009). **The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: Stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus Thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports**. Enzyme and Microbial Technology, 44, 139-144.
- Bromberg, A., Marx, S. & Frishman, G. (2008). **Kinetic study of the thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices**. Biochimica et Biophysica Acta, 1784, 961-996.
- Catana, R., Eloy, M., Rocha, J.R., Ferreira, B.S., *et al.* (2007). **Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis**. Food Chemistry, 101, 260-266.
- Chen, W. & Liu, C. (1996). **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus***. Enzyme and Microbial Technology, 18 (2), 153-160.
- Cornish-Bowden, A. (1995). **Fundamentals of Enzyme Kinetics**. Portland Press, London.
- Doran, P.M. (2002). **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, New York.
- Dosztányi, Z., Fiser, A. & Simon, I. (1997). **Stabilization Centers in Proteins: Identification, Characterization and Predictions**. Journal of Molecular Biology, 272, 597-612.
- Fogler, H.S. (1999). **Elements of chemical reaction engineering**. 3rd Ed., Prentice Hall, New Jersey.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A. & Roberfroid, M.B. (2004). **Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics**. Nutrition Research Reviews, 17, 259-275.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterisation of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.**. Applied Microbiology Biotechnology, 79, 589-596.
- Hidaka, H., Hirayama, M. & Sumi, N. (1998). **A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611**. Agricultural and Biological Chemistry, 52 (5), 1181-1187.
- Lumry, R. & Eyring, H. (1954). **Conformation changes of proteins**. The Journal of Physical Chemistry, 58, 110-120.
- Lüscher, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., *et al.* (1996). **Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubse of *Heliantus tuberosus***. FEBS Letters, 385, 39-42.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico**. Patent: PI 070683-1, Brazil Office.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49 (1-6), 43-49.
- Nadeem, M., Perveen, R., Javed, M.R., Nadeem, H. & Rashid, M.H. (2007). **Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp.** (2007). Enzyme and Microbial Technology, 41, 558-564.
- Nemukula, A., Mutanda, T., Wilhemi, B.S. & Whiteley, C.G. (2009). **Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus***. Bioresource Technology, 100, 2040-2045.

- Ó'Fágáin, C. (2003). **Review: Enzyme stabilization – recent experimental progress.** Enzyme and Microbial Technology, 33, 137-149.
- Ó'Fágáin, C. (1997). **Stabilizing Protein Function.** Springer Verlag, Berlin.
- Papinutti, L., Dimitriu, P. & Forchiassin, F. (2008). **Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases.** Bioresource Technology, 99, 419-424.
- Ruth, D.M., Buckley, S.J., O'Connor, B.F.O. & Ó'Fágáin, C. (2007). **Solvent and thermal stability, and pH kinetics, of praline-specific dipeptidyl peptidase IV-like enzyme from bovine serum.** Enzyme and Microbial Technology, 41, 307-311.
- Sadana, A. (1998). **Enzyme deactivation.** Biotechnology Advances, 6, 349-446.
- Santos, A.M.P., Oliveira, M.G. & Maugeri, F. (2007). **Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor desing.** Bioresources Technology, 98, 3142-3148.
- Šikšnis, V., Mozhaev, V.V., Galkantaite, N., Melik-Nubarov, N.S., *et al.* (1990). **Unusual (zig-zag) temperature dependence of the rate constant for irreversible inactivation of hydrophilized enzymes.** Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 55, 1366-1371.
- Tanriseven, A. & Aslan, Y. (2005). **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides.** Enzyme and Microbial Technology, 36, 550-554.
- Trevan, M.D. (1980). **Immobilized Enzymes – an Introduction and Applications in Biotechnology.** John Wiley & Sons, New York.

**Optimization of fructooligosaccharides synthesis by
immobilized fructosyltransferase**

Resumo

A metodologia de planejamento experimental foi aplicada no estudo da otimização da produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) pela frutossiltransferase (FTase) extracelular e parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 e imobilizada em liga de nióbio e grafite. Com base nas caracterizações do biocatalisador apresentadas nos Capítulos 2 e 4, selecionou-se quatro fatores de importância para este estudo: temperatura, pH, concentração inicial de sacarose (g/L) e concentração enzimática na síntese (U_i/mL). Foram aplicados dois Delineamentos Fatoriais Fracionados do tipo 2⁴⁻¹ em sequência, cujas respostas das combinações dos fatores entre si sobre a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) e composições dos FOS (φGF_n) permitiram selecionar com confiança a concentração enzimática de 20 U_i/mL e o pH 6,0 como melhores condições, entretanto, não foi possível definir as condições de temperatura e concentração inicial de sacarose. Desta forma, devido a complexidade do sistema e aos valores de R² obtidos nos dois delineamentos, não foi possível proceder a análise da ANOVA ou obter superfícies de respostas, mas, com base nos resultados obtidos foram escolhidas: 4 temperaturas dentro da faixa delimitada pelos dois delineamentos e 2 concentrações iniciais de sacarose, tendo como base os conhecimentos sobre a cinética enzimática; então novos experimentos foram realizados com o pH e concentração enzimática fixos, para validação dos resultados e seleção das condições otimizadas. Com o auxílio do teste de Tukey, foi possível definir a concentração de 500 g/L de sacarose, a temperatura de 48°C além do tempo de síntese de 24 h como condições otimizadas. Por fim, sob estas condições foi possível obter, em comparação com a condição não otimizada, um valor de Y_{FOS} de 0,58 um aumento de 5%, uma composição de GF₃ 40% maior, além da redução do tempo de síntese de 96 para 24 h o que representa um aumento de 6 vezes sobre a produtividade do sistema (12 g/L.h).

Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase

E. Aguiar-Oliveira, M. I. Rodrigues & F. Maugeri

Abstract

The optimization of fructooligosaccharides (FOS) synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 was carried out on the basis of the experimental factorial design methodology, consisting of two consecutives (2^{4-1}) Fractional Factorial Design (FFD) for the following variable factors: temperature, pH, initial sucrose concentration and immobilized enzyme activity. The main target responses were FOS yield and FOS composition. It was observed that the increase of the immobilized enzyme activity resulted in a greatly increase of the amount of nystose (GF₃) in the FOS mixture but, it also increased the residual fructose concentration in the medium over time. Based on the results from the two FFD, the best conditions for pH and enzyme activity were 6.0 and 20 U_i/mL respectively. The final study step allowed to the best conditions for synthesis temperature and sucrose concentration, which are 48°C and 50% (w/v), respectively. Under these optimized conditions the total synthesis time was reduced from 96 h to 24 h, the conversion of sucrose was increased by 5% ($Y_{\text{FOS}} = 0.58$) and the composition of GF₃ by 40% ($\phi_{\text{GF}_3} = 0.035$).

Keywords: Enzymatic Synthesis, FOS, Fractional Factorial Design, Immobilized Fructosyltransferase, Niobium, Optimization.

Current Chemical Biology, 2012.
In the press.

1- Introduction

The fructooligosaccharides (FOS) are oligomers (GF_n) composed by “n” fructosyl groups (2 < n < 7) linked in the β-2,1 position having a terminal glucose (Markosyan *et al.*, 2003; Zuleta & Sambucetti, 2001). According to the polymerization degree (n), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) are the most common components in FOS mixtures (Figure 1); these oligosaccharides have been classified as prebiotics (Gibson & Roberfroid, 1995; Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2008; Gibson *et al.*, 2004; Mysore *et al.*, 2005; Passos & Park, 2003; Sangeetha *et al.*, 2005(a); Stewart *et al.*, 2008; Tanriseven & Aslan, 2005; Zheng *et al.*, 2006).

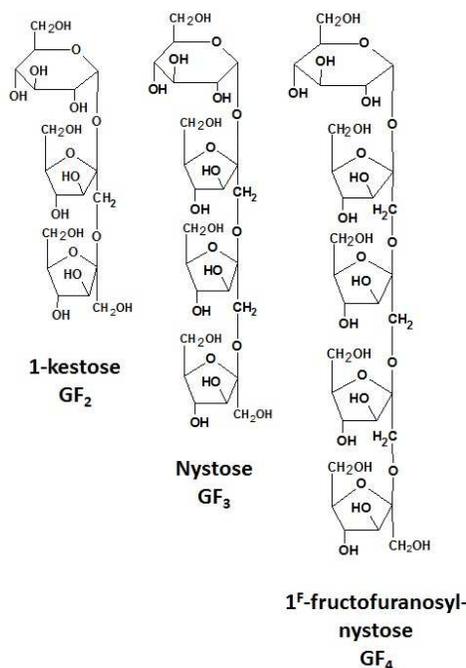


Figure 1: Chemical structures of the most common fructooligosaccharides (FOS): 1-kestose (GF₂; MW = 504.44; C₁₈H₃₂O₁₆), nystose (GF₃; MW = 666.58; C₂₄H₄₂O₂₁) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄; MW = 828.72; C₃₀H₅₂O₂₆).

An ideal beneficial composition and concentration of FOS has not been determined yet. However, it is believed that FOS with longer saccharide chain are more beneficial, as they are resistant against microbial fermentation and promote mineral absorption (Stewart *et al.*, 2008); other reports suggested that 1-kestose has better prebiotic effect compared to the nystose (Suzuki *et al.*, 2006). The FOS can naturally be obtained from fruits and vegetables; however, the use of a biotechnological process can increase significantly FOS production from sucrose, especially with immobilized enzymes, like fructosyltransferases (Maiorano *et*

al., 2008). The application of immobilized enzymes allows the continuous use of a biocatalyst and also the efficient separation and/or removal of the biocatalyst from the reactive medium, avoiding an additional downstream step to the process.

Concerning downstream process, the purification of FOS from enzymatic synthesis consists in separating mono and disaccharides from the final syrup, especially glucose, while sucrose and fructose residues remain at low concentrations (Kuhn & Maugeri, 2010 (b) and (a); Vaňková & Polakovič, 2010). It is thus important that the final syrup from FOS synthesis presents low concentrations of sucrose and fructose, meaning a good conversion and low hydrolyzing activity, respectively. Markosyan and colleagues (2003) presented a very interesting process for transformation of the residual sucrose from FOS synthesis into palatinose and trehallulose - both reducing sucrose isomers suitable for diabetes patients - by the action of the isomaltulose synthase produced by *Ptotaminobacter rubrum* (St-0500).

The enzyme fructosyltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) can be obtained from filamentous fungi, bacteria and yeast (Sangeetha *et al.*, 2005(a); Maiorano *et al.*, 2008); actually the enzymes used in industrial FOS synthesis are produced by the filamentous fungus *Aspergillus niger* (Hidaka *et al.*, 1988), by the yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* (Yun, 1996) and also by the bacteria *Bacillus macerans* (Kim *et al.*, 1998), while yeasts are rarely considered as sources of fructosyltransferases, since their enzymes has high sucrose hydrolyzing activity, along with the transfructosylation activity (Kono *et al.*, 1994). However, the yeast *Rhodotorula* sp. LEB-V10 isolated from flowers from the Brazilian Atlantic Forest produces an extracellular fructosyltransferase with high transfructosylation activity (Maugeri & Hernalsteens, 2007), enabling it as potential candidate for industrial production of FOS from sucrose (Maugeri *et al.*, 2007).

The extracelullar fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 is a dimeric protein with subunits of approximate size of 75 and 124 kDa, and optimal pH at 4.5 (Hernalsteens & Maugeri, 2008). The recovery of this enzyme from the fermented medium can be carried out by a simple precipitation with ethanol (recovering yield of 86%), which gives a concentrated partially purified enzymatic solution with higher transfructosylation and low hydrolyzing activities (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010).

It has been shown by Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010) that the immobilization of the fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, by adsorption in a solid-acid compound of niobium and graphite, led to two optimum pH activity, 6.0 and 4.5, behavior not observed with the free enzyme, that has an optimum pH at 4.5 (Hernalsteens & Maugeri, 2008). Additionally, at pH 6.0, the immobilized enzyme revealed a higher thermal stability than at pH 4.5 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010 and 2011). Studies on the kinetics of fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. in free (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2011) and immobilized (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) forms revealed that concentrations above 78.5% of sucrose (w/v) inhibited the free enzyme, while for the immobilized enzyme the inhibition begins at 60% (w/v) of sucrose concentration.

Hernalsteens and Maugeri (Hernalsteens & Maugeri, 2008) described a conversion of 48% to 63% after 72 h with the free and purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10; Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010), in a recent work, reported the application of this enzyme in a partially purified form, and immobilized in niobium-graphite alloy, revealing promising results when compared to current commercial methods, with FOS yield of 0.56 (pH 4.5) and 0.59 (pH 6.0), after 96 h and using 14 U_i/mL. Kinetic modeling studies carried out with this same fructosyltransferase at 5 U_i/mL revealed that the conversion of sucrose into FOS, with about 47% of yield, could be achieved after 96 h of synthesis, with either immobilized purified or partially purified enzyme (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010); therefore, the use of a pure enzyme solution for FOS production shows no clear advantages, and should even be avoided, since enzyme purification will increase the costs of the process. Other authors (Chen & Liu, 1996; Sangeetha *et al.*, 2005(a) and 2004) reported conversions of sucrose into FOS of 30 to 60% with enzymes from different sources.

It is very important, however, that a biotechnological process is optimized, or better understood concerning the operational ranges and factors that really are meaningful. For this purpose, factorial experimental design is a powerful tool, with great reliability because it allows several factors to be analyzed simultaneously, with different combinations (Anjun *et al.*, 1997; Bas & Boyaci, 2007; Rodrigues & Iemma, 2009). In general, for a number of factors (k) higher than four, the choice of factorial design is justified by the complexity, time and cost of experiments. Fractional Factorial Designs (2^{k-1}) carried out sequentially enable the

achievement of optimal operational conditions, since it allows the study of different parameter ranges in each step, allowing the elimination of insignificant variables and the funneling for the optimal values. As an example, Nemukula and coworkers (2009) evaluated the production of FOS by fructosyltransferase purified from *A. aculeatus* by performing two (2³) standard Box-Wilson central composite design in sequence, using also a response surface methodology.

The main goal of this work was to optimize the FOS synthesis conditions by the partially purified extracellular fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, which was immobilized by adsorption in a niobium-graphite alloy (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010). The entire process of FOS production has been developed in laboratory scale, and a simple, easy scale-up and cost-effective method was developed. The fermentation medium is composed by agro-industrial by-products (sugar cane molasses and corn steep liquor), the enzyme precipitation is carried out with ethanol and the enzyme immobilization is achieved by surface adsorption.

2- Material and Methods

2.1- Material

The strain of *Rhodotorula* sp. LEB-V10 (Laboratory of Bioprocess Engineering, UNICAMP, Brazil) was isolated from Brazilian Atlantic Forest by Maugeri and Hernalsteens (2007). The sugar cane molasses and corn steep liquor used as substrates in the medium cultivation were kindly provided by *The Usina Estér* – Campinas-SP/Brazil and Corn Products – Mogi Guaçu-SP/Brazil, respectively. The glucose was determined by using an enzymatic glucose-oxidase kit from Labor Lab® (Guarulhos-SP/Brazil). The solid-acid niobium-graphite alloy (~95% Nb), used as the enzyme support, was manufactured and provided by the Brazilian Company of Metallurgy and Mining - CBMM (Araxá-MG/Brazil). The standards of FOS (GF₂, GF₃ and GF₄) were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. All other reagents were acquired from reliable and available commercial sources.

2.2- Enzyme production

The cultivation conditions of *Rhodotorula* sp. LEB-V10 and partial purification of the extracellular fructosyltransferase were described previously (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010 and 2011). The concentrated enzymatic solution with high transfructosylation activity, which was used in all experiments, was obtained by ethanol precipitation and re-suspended in acetate buffer 50 mM at pH 4.5.

2.3- Inorganic support and enzyme immobilization

Particles of the solid-acid niobium-graphite compound, measuring between 65 and 80 Mesh (212 – 180 μm), were obtained by grinding and cleaned according to Aguiar-Oliveira and Maugeri (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010). The immobilization method (adsorption) was also described by Maugeri and Aguiar-Oliveira (2007).

2.4- Determination of the enzymatic activity and related parameters

According to Chen and Liu (1996) and Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010), one transfructosylation activity unit for immobilized enzyme (U_i) is defined as 1 μmol of transferred fructose (F_T) per minute per g of support (Equation 1) and one hydrolyzing activity unit (U_{iH}) as 1 μmol of glucose (G) released per minute per gram of support (Equation 2).

$$U_i = F_T/g = [\mu\text{mol}/\text{min.g}] \quad (01)$$

$$U_{iH} = G/g = [\mu\text{mol}/\text{min.g}] \quad (02)$$

RS is the total reducing sugar, which determines the total amount of transferred fructose, according to the basic relations: $RS = F + G$ and $F_T = G - F$, which leads to Equation 3 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010 and 2011; Chen & Liu, 1996; Hernalsteens & Maugeri, 2008).

$$F_T = (2G - RS) = [\mu\text{mol}] \quad (03)$$

The standard determination of the enzymatic activity (free and immobilized) was carried out at 60°C in acetate buffer 50 mM / pH 4.5, with 50% sucrose (w/v). The reducing sugars (RS) were determined by the Somogyi-Nelson's methodology and the glucose (G) by the enzymatic glucose-oxidase kit. Calculation of the activity was

performed as described by Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010) and Alvarado-Huallanco and Maugeri-Filho (2010).

2.5- FOS synthesis

Based on the previous works with free (Hernalsteens & Maugeri, 2008) and immobilized (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, the standard non-optimized conditions corresponds to: initial sucrose concentration 50% (w/v), temperature of 50°C, pH 4.5 and 6 U_i/mL of immobilized enzyme activity in acetate buffer 50 mM. All syntheses were performed in shaking flasks with a total volume of 15 mL, and a reaction volume of 5 mL. Samples were taken at regular interval times for FOS determination. Samples were diluted (1:100) and immediately immersed in boiling water, kept for 5 minutes, and followed by cooling in ice bath for 5 min, as described by Hernalsteens and Maugeri (2008).

2.6- Identification and quantification of sugars

Quantification of sucrose, glucose, fructose and FOS were carried out by ion exchange chromatography (HPLC-PAD), using a Dionex DX-500 system (Sunnyvale, CA, EUA) operated as described by Maugeri and Hernalsteens (2007).

2.7- Conversion of sucrose and FOS composition

The conversion of sucrose into FOS (g/g) was determined according to Equation 4 and the FOS fractional composition according to Equation 5, where the total FOS concentration [FOS] corresponds to the sum of all fructooligosaccharide concentrations after a time “t” of synthesis and [GF_n] is the concentration of each FOS component in the same time “t” of synthesis, with “n” varying between 2 and 4 for 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄). In the experiments, the initial concentration of sucrose [GF^o] ranged from 400 to 700 g/L.

$$Y_{FOS} = \frac{[FOS]}{[GF^o]} \quad (04)$$

$$\phi GF_n = \frac{[GF_n]}{[FOS]} \quad (05)$$

2.8- Fractional Factorial Designs for FOS synthesis

Based on the experimental factorial design methodology, two consecutives (2^{4-1}) Fractional Factorial Design (FFD) were carried out. The factors selected were temperature (x_1), pH (x_2), initial sucrose concentration (x_3) and immobilized enzymatic activity (x_4). Tables 1 and 3 show the levels (coded and real values) and the set of all performed experiments as established by each (2^{4-1}) Fractional Factorial Design.

The considered responses were conversion of sucrose into FOS (Y_{FOS}) given by Equation 4, and FOS fractional composition (ϕGF_n) given by Equation 5 at: 24, 48, 72 and 96 h of synthesis. The residual compositions of sucrose ($\phi GF = [GF]/[GF^\circ]$), glucose ($\phi G = [G]/[GF^\circ]$) and fructose ($\phi F = [F]/[GF^\circ]$) during synthesis time were also monitored, but only the results from optimized conditions are shown in Figure 3.a.

The statistical main effect estimates for the above factors were performed at 85% of confidence (p-value < 0.15), since in Fractional Factorial Designs is preferable to be less rigorous than eliminate any factor which may be important for the process. Another important aspect to take into account is that statistical evaluations of biotechnological processes, such as enzymatic synthesis, can be very complex. The FOS syntheses with fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp., for example, can be performed at two distinct optimum pH values (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), with different deactivation energy for each pH (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011), so that a strict confidence level can lead to loss of important process information.

All statistical analyses were performed with STATISTICA Software (Stat-Soft, Inc. 2001, USA).

2.9- Optimization

According to the results from the two consecutives (2^{4-1}) Fractional Factorial Designs, which led to suitable ranges for pH and enzyme activity, new synthesis were carried out to validate the synthesis conditions at four temperatures and two initial sucrose concentrations. For these assays, the pH and enzymatic activity were kept at constant values, respectively: 6.0 and 20 U_i/mL. The temperatures were 46, 48, 50 and 52°C and the

initial sucrose concentrations were 50 and 55% (w/v), performing eight new conditions of synthesis, which were carried out in triplicate.

3- Results and Discussion

3.1- First (2^{4-1}) Fractional Factorial Design

The results of the 11 assays for the first Fractional Factorial Design are shown in Table 1, while Table 2 shows the effect of each individual factor at 85% of confidence.

According to the results in Table 2, the temperature variation from 45 to 55°C has a statistically significant and positive effect for both FOS yields (Y_{FOS}) and 1^F-fructofuranosyl-nystose composition (ϕGF_4), from 48 h on, performing an increase in Y_{FOS} and ϕGF_4 . Similarly for the pH, it can be seen that when there is an increase from 4.0 to 6.0, a positive effect for Y_{FOS} and ϕGF_3 can be detected, while there is a negative effect for ϕGF_2 , which indicates that GF_2 is more intensively transformed into GF_3 , according to kinetic model by Alvarado-Huallanco and Maugeri-Filho (2010). Therefore, according to the above results, the pH 6.0 is a suitable condition for FOS synthesis. Additionally, Aguiar-Oliveira and Maugeri (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010), reported that pH 6.0 improves thermal stability of the immobilized enzyme, which is also an interesting parameter that should be taken into account. On the other hand, the effect of initial sucrose concentration from 50 to 70% (w/v) was not significant for Y_{FOS} , ϕGF_2 and ϕGF_3 . However, for ϕGF_4 , the initial sucrose concentration was statistically significant after 48 h of reaction, resulting in a decrease of this component. The central points (curvature) were not statistically significant for Y_{FOS} at any time; one reasonable explanation would be that the initial sucrose concentration (60% w/v) corresponds to the concentration for substrate inhibition with the immobilized fructosyltransferase (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri, 2010). The statistical analysis from Table 2 shows also that the increase in the enzymatic activity [E] led to a positive effect in ϕGF_4 during the reaction time.

Table 1: Data of the first (2^{4-1}) Fractional Factorial Design with real and coded (in brackets) values for four variables (factors) and four response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4), during synthesis time.

Runs	Factors				Response values for major products															
					$Y_{FOS} = [FOS]/[GF^0]$				$\phi GF_2 = [GF_2]/[FOS]$				$\phi GF_3 = [GF_3]/[FOS]$				$\phi GF_4 = [GF_4]/[FOS]$			
	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
[1]	45 (-1)	4 (-1)	50 (-1)	4 (-1)	0.24	0.24	0.23	0.20	0.77	0.75	0.72	0.71	0.22	0.23	0.25	0,25	0.011	0.019	0.026	0.032
[2]	55 (+1)	4 (-1)	50 (-1)	8 (+1)	0.46	0.54	0.55	0.53	0.87	0.75	0.68	0.63	0.11	0.22	0.29	0,33	0.021	0.027	0.037	0.045
[3]	45 (-1)	6 (+1)	50 (-1)	8 (+1)	0.55	0.63	0.63	0.62	0.59	0.52	0.47	0.43	0.38	0.46	0.50	0,54	0.023	0.029	0.033	0.034
[4]	55 (+1)	6 (+1)	50 (-1)	4 (-1)	0.46	0.60	0.65	0.65	0.66	0.58	0.51	0.46	0.32	0.39	0.47	0,51	0.017	0.024	0.028	0.033
[5]	45 (-1)	4 (-1)	70 (+1)	8 (+1)	0.31	0.33	0.31	0.28	0.92	0.88	0.87	0.85	0.07	0.10	0.11	0,13	0.011	0.019	0.023	0.023
[6]	55 (+1)	4 (-1)	70 (+1)	4 (-1)	0.36	0.51	0.56	0.59	0.73	0.66	0.60	0.56	0.25	0.32	0.37	0,42	0.019	0.024	0.024	0.024
[7]	45 (-1)	6 (+1)	70 (+1)	4 (-1)	0.36	0.51	0.62	0.62	0.77	0.65	0.56	0.54	0.21	0.33	0.42	0,44	0.018	0.019	0.021	0.022
[8]	55 (+1)	6 (+1)	70 (+1)	8 (+1)	0.43	0.55	0.59	0.60	0.84	0.75	0.66	0.59	0.14	0.23	0.30	0,36	0.019	0.028	0.037	0.043
[9]	50 (0)	5 (0)	60 (0)	6 (0)	0.38	0.51	0.56	0.55	0.88	0.80	0.73	0.68	0.09	0.17	0.24	0,29	0.027	0.031	0.031	0.033
[10]	50 (0)	5 (0)	60 (0)	6 (0)	0.38	0.50	0.54	0.55	0.89	0.83	0.76	0.68	0.09	0.14	0.22	0,28	0.026	0.030	0.029	0.034
[11]	50 (0)	5 (0)	60 (0)	6 (0)	0.38	0.50	0.54	0.56	0.87	0.81	0.75	0.69	0.11	0.16	0.22	0,28	0.024	0.030	0.034	0.034

^a x_1 = temperature ($^{\circ}C$)

^b x_2 = pH

^c x_3 = initial sucrose concentration: $[GF^0]$ (% , w/v)

^d x_4 = immobilized enzyme concentration: $[E]$ (U_i/mL)

Table 2: Statistical analysis of the first (2^{4-1}) Fractional Factorial Design: effects estimates for the 4 response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4) and the curvature (central points) considering 4 factors: temperature ($^{\circ}C$), pH, initial sucrose concentration [GF^0] and immobilized enzyme concentration [E].

	$Y_{FOS} = [FOS]/[GF^0]$				$\phi GF_2 = [GF_2]/[FOS]$				$\phi GF_3 = [GF_3]/[FOS]$				$\phi GF_4 = [GF_4]/[FOS]$			
	<i>Time</i> 24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Media	0.40	0.49	0.52	0.51	0.77	0.69	0.63	0.60	0.21	0.28	0.34	0.37	0.017	0.023	0.029	0.032
Curvature	-0.04	0.03	0.06	0.09	0.22	0.24	0.22	0.17	-0.23	-0.25	-0.23	-0.18	0.017	0.013	0.005	0.004
(x₁) T ($^{\circ}C$)	0.06	0.12	0.14	0.16	0.01	-0.01	-0.04	-0.07	-0.02	0.01	0.04	0.06	0.003	0.005	0.006	0.008
(x₂) pH	0.11	0.17	0.21	0.22	-0.10	-0.14	-0.17	-0.18	0.10	0.14	0.17	0.18	0.004	0.003	0.002	0.002
(x₃) [GF^0] (% w/v)	-0.06	-0.03	0.01	0.02	0.09	0.08	0.08	0.08	-0.09	-0.08	-0.08	-0.07	-0.002	-0.003	-0.005	-0.008
(x₄) [E] (U_i/mL)	0.08	0.05	0.01	-0.01	0.07	0.06	0.07	0.06	-0.08	-0.07	-0.08	-0.06	0.002	0.004	0.008	0.009

» bold characters are the statistically significant effects ($p < 0.15$)

3.2- Second (2^{4-1}) Fractional Factorial Design (FFD)

A new experimental design was then carried out, considering the above results, which led to the set of assays shown in Table 3, where the ranges of the four factors studied on the first design were changed. Table 4 shows the effects of each factor on FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ and 4), during the synthesis time.

In these experiments the temperature of the central point was changed to 52°C and the (+1) level was increased by 5°C , in order to evaluate whether the temperature effect is positive and significant in this new range. For the pH, the range was also changed, ranging between 4.5 and 6.5, in order to check the transferase potentiality of the enzyme. According to Plou *et al.* (2007) the differentiation between a β -fructofuranosidase and a fructosyltransferase is based on the transferase to hydrolyzing activities ratio, especially at low substrate concentrations, and a maximal FOS production depends on this ratio. The parameter R_{TF} (transfructosylation activity/hydrolyzing activity ratio) (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) indicates the strength of the transfructosylation activity in comparison to the hydrolyzing activity, both activities being inherent to fructosyltransferase, and hydrolytic activity is only higher than transfructosylation activity in low sucrose concentrations (below 100 g/L) (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008); for the enzyme from *Rhodotorula* sp., the R_{TF} values are 1.34, 1.60 and 1.51 at the pH of 5.5, 6.0 and 6.5, respectively (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010). The lowest coded level (-1) for sucrose initial concentration [GF°] was changed to 40% (w/v), thus providing a central condition away from the substrate inhibition condition. Changes in immobilized enzymatic activity [E] were also carried out with the aim of evaluating comparatively the effect of activities 2.5 times higher than in the first experimental design.

Table 3 reveals that, in comparison with the first Fractional Factorial Design (Table 1), there is a clear difference of performance for the central points. In the second experimental design, the central point results (runs 9, 10 and 11 from Table 3) were the best among the 11 runs, which is proved by the statistical analysis of the curvature (Table 4). According to these results, it is possible to say that the combination between the temperature at 52°C (within the range originally given as favorable to FOS synthesis in the

Table 3: Data for the second (2^{4-1}) Factorial Fractional Design with real and coded (in brackets) values for four variables (factors) and four response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4), during synthesis time.

Runs	Factors				Response values for major products															
					$Y_{FOS} = [FOS]/[GF^0]$				$\phi GF_2 = [GF_2]/[FOS]$				$\phi GF_3 = [GF_3]/[FOS]$				$\phi GF_4 = [GF_4]/[FOS]$			
	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
[1]	44 (-1)	4.5 (-1)	40 (-1)	8 (-1)	0.55	0.55	0.54	0.50	0.87	0.78	0.69	0.62	0.11	0.19	0.23	0.26	0.019	0.030	0.080	0.116
[2]	60 (+1)	4.5 (-1)	40 (-1)	20 (+1)	0.38	0.38	0.32	0.26	0.80	0.71	0.69	0.67	0.16	0.24	0.26	0.27	0.042	0.050	0.051	0.058
[3]	44 (-1)	6.5 (+1)	40 (-1)	20 (+1)	0.57	0.52	0.47	0.43	0.78	0.62	0.51	0.43	0.18	0.29	0.33	0.36	0.033	0.096	0.159	0.202
[4]	60 (+1)	6.5 (+1)	40 (-1)	8 (-1)	0.45	0.48	0.47	0.46	0.73	0.67	0.65	0.64	0.23	0.29	0.31	0.32	0.039	0.044	0.047	0.048
[5]	44 (-1)	4.5 (-1)	70 (+1)	20 (+1)	0.54	0.52	0.48	0.45	0.83	0.71	0.60	0.54	0.15	0.24	0.28	0.31	0.020	0.054	0.108	0.158
[6]	60 (+1)	4.5 (-1)	70 (+1)	8 (-1)	0.37	0.41	0.41	0.40	0.77	0.69	0.68	0.66	0.20	0.27	0.29	0.30	0.031	0.032	0.037	0.039
[7]	44 (-1)	6.5 (+1)	70 (+1)	8 (-1)	0.45	0.53	0.54	0.52	0.93	0.85	0.78	0.73	0.06	0.13	0.18	0.21	0.015	0.016	0.043	0.063
[8]	60 (+1)	6.5 (+1)	70 (+1)	20 (+1)	0.54	0.53	0.51	0.48	0.49	0.38	0.34	0.32	0.43	0.48	0.49	0.49	0.079	0.134	0.170	0.190
[9]	52 (0)	5.5 (0)	55 (0)	14 (0)	0.57	0.58	0.55	0.54	0.56	0.42	0.35	0.30	0.38	0.47	0.50	0.51	0.055	0.103	0.150	0.190
[10]	52 (0)	5.5 (0)	55 (0)	14 (0)	0.57	0.58	0.56	0.54	0.56	0.42	0.35	0.30	0.38	0.48	0.50	0.52	0.055	0.106	0.154	0.188
[11]	52 (0)	5.5 (0)	55 (0)	14 (0)	0.57	0.57	0.56	0.54	0.56	0.43	0.34	0.30	0.38	0.47	0.50	0.51	0.058	0.106	0.151	0.186

^a x_1 = temperature ($^{\circ}C$)

^b x_2 = pH

^c x_3 = initial sucrose concentration: $[GF^0]$ (% w/v)

^d x_4 = immobilized enzyme concentration: $[E]$ (U_i/mL)

Table 4: Statistical analysis of the second (2^{4-1}) Fractional Factorial Design: effects estimates for the 4 response: FOS yield (Y_{FOS}) and FOS composition (ϕGF_n , $n = 2, 3$ or 4) and the curvature (central points) considering 4 factors: temperature ($^{\circ}\text{C}$), pH, initial sucrose concentration [GF°] and immobilized enzyme concentration [E].

	$Y_{\text{FOS}} = [\text{FOS}]/[\text{GF}^{\circ}]$				$\phi\text{GF}_2 = [\text{GF}_2]/[\text{FOS}]$				$\phi\text{GF}_3 = [\text{GF}_3]/[\text{FOS}]$				$\phi\text{GF}_4 = [\text{GF}_4]/[\text{FOS}]$			
	<i>Time</i> 24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Media	0.48	0.49	0.47	0.44	0.78	0.68	0.62	0.57	0.19	0.27	0.29	0.32	0.035	0.057	0.087	0.109
Curvature	0.18	0.17	0.18	0.20	-0.43	-0.51	-0.54	-0.55	0.39	0.41	0.41	0.40	0.042	0.096	0.130	0.157
(x₁) T ($^{\circ}\text{C}$)	-0.09	-0.08	-0.08	-0.07	-0.15	-0.13	-0.06	-0.01	0.13	0.11	0.08	0.06	0.026	0.016	-0.021	-0.051
(x₂) pH	0.04	0.05	0.06	0.07	-0.08	-0.09	-0.10	-0.09	0.07	0.06	0.06	0.06	0.014	0.031	0.036	0.033
(x₃) [GF°] (%w/v)	-0.01	0.01	0.03	0.05	-0.04	-0.03	-0.03	-0.03	0.04	0.03	0.03	0.02	0.003	0.004	0.005	0.007
(x₄) [E] (U/mL)	0.05	0.00	-0.04	-0.07	-0.10	-0.14	-0.16	-0.17	0.08	0.09	0.09	0.09	0.018	0.053	0.070	0.086

» bold characters are the statistically significant effects ($p < 0.15$)

first factorial design), the pH 5.5 (with a R_{TF} ratio of 1.34, which is close to the one at pH 6.0) and a two-fold higher immobilized enzyme activity (14 U_i/mL) were favorable to the synthesis.

In Table 4 it can be seen that, in general, the factors temperature (x_1), pH (x_2) and initial sucrose concentration (x_3), in the ranges studied, are not significant. On the other hand, the immobilized enzyme activity (x_4) showed statistical significance since there was a 1-kestose (GF₂) content reduction and a significant increase in 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄), in all evaluated times.

The average value for ϕ GF₄ increased more than 3 times, after 96 h of synthesis in the second Fractional Factorial Design (Table 3); however, there was an inevitable and undesirable increase in the concentration of residual fructose after 48 h of synthesis (data not presented). These results indicate that unlike the first Fractional Factorial Design, where the synthesis showed an average increase of Y_{FOS} up to 72 h, this second Fractional Factorial Design led to Y_{FOS} increases up to 48 h of synthesis. The initial sucrose concentration [GF^o] is not statistically significant at the range studied, for none of the responses.

3.3- Selection of significant variables

According to Nemukula and coworkers (2009), for a fructosyltransferase from a filamentous fungus, only two factors are important for synthesis of FOS: sucrose concentration and intrinsic properties of the enzyme. However, a more complex response was obtained in this work with the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.: the increase in factor x_4 (immobilized enzyme activity, [E]) led to an increase of 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) fraction and a decrease in Y_{FOS} due to the inevitable increase of the residual fructose (data not presented). According to Markosyan and colleagues (2003) the FOS yield in the final syrup is limited to 50-55% because of the glucose inhibition effect. Cairns (1995) reporting that at high enzymatic concentrations, the free fructosyltransferase from *H. tuberosus* produces only molecules with polymerization degree (n) above 3, which proves that the FOS synthesis process is very depend on the source of the enzyme.

The operation of a bioreactor with low concentrations of enzyme is clearly unfeasible, because the time required for the substrate depletion is relatively long, leading to high residual sucrose, despite the low residual fructose, which could affect the downstream process for the FOS purification, as observed in recent FOS purification studies (Kuhn & Maugeri, 2010 (a) and (b)). For this reason, the immobilized enzyme activity was fixed at 20 U_i/mL. Additionally, the pH 6.0 was chosen, since at this pH the thermal stability and the R_{TF} ratio are higher than at pH 5.5 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010 and 2011), spite of the second Fractional Factorial Design indicates the pH 5.5 as the best one.

In both Fractional Factorial Design the initial sucrose concentration was not statistically significant, neither for the FOS yield (Y_{FOS}) nor for its fractional components (ϕGF_n). That is probably due to the fact that sucrose concentrations were chosen in order to avoid substrate inhibition and the undesirable hydrolyzing activity, which is higher at low sucrose concentrations (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008). Since 50% (w/v) is the standard sucrose concentration for FOS synthesis (Hernalsteens & Maugeri, 2008) and 60% (w/v) is an inhibitory concentration (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) for this enzyme, the sucrose concentrations of 55% and 50% (w/v) were chosen for data validation. Also, according to the first Fractional Factorial Design, the temperature range between 45 and 55°C was favorable to the synthesis of FOS and from the second Fractional Factorial Design the maximum conversions were obtained at 52°C, so that for data validation four temperatures were selected (52, 50, 48 and 46°C), as described in "Material and Methods." As comparison, Nemukula and coworkers (2009) reported that an inhibitory effect for the production of GF₃ and GF₄ was observed when the reaction with fructosyltransferase from *A. aculeatus* was carried out at 70°C.

Another important feature obtained from the results of the second Fractional Factorial Design was related to the reaction time: when the immobilized enzyme activity [E] was increased, the time needed to reach the highest FOS yield decreased to somewhat between 24 and 48 h, in contrast to those between 72 and 96 h, as observed in the first FFD, and also as reported in the literature with the free (Hernalsteens & Maugeri, 2008) and immobilized enzyme (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010).

3.4- Optimization of temperature and sucrose concentration

The results for optimization of the temperature and sucrose concentration are depicted in Figure 2. It can be seen that between 18 and 24 h the highest Y_{FOS} are obtained either for 50 or 55% (w/v) of initial sucrose concentration. In the first 12 h of synthesis the conversion is generally low, and after 24 h Y_{FOS} decreases and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) and residual fructose concentrations increase. The same features were reported by Kim and coworkers (1998), in which work the authors suggested syntheses of 48 h for higher production of GF₄, using a fructosyltransferase from *B. macerans*.

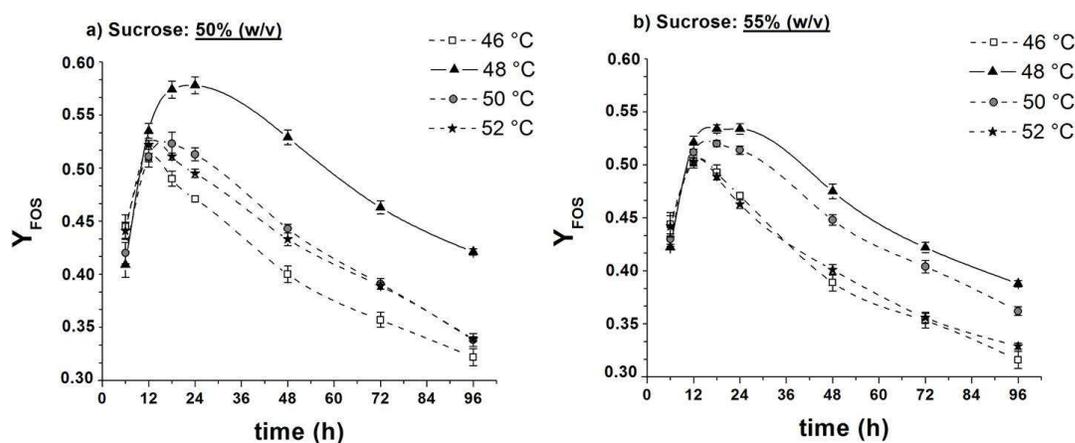


Figure 2: Yield of FOS (Y_{FOS}) at different temperatures: 46°C (white square); 48°C (black triangle); 50°C (grey circle) and 52°C (black star); the synthesis were carried out at pH 6.0, 20 U/mL and with: **a)** 50% and **b)** 55% (w/v) of initial sucrose concentration. Standard errors values ranged from 0.003 to 0.012.

Considering the Figure 2, it can be seen that the temperature of 48°C is the most favorable for FOS synthesis, leading to higher FOS yields between 18 and 24 h. The sucrose concentration of 50% (w/v) led to a Y_{FOS} about 0.58 (~288.14 g/L) and at 55% (w/v) led to a Y_{FOS} about 0.53 (~293.72 g/L). The Tukey's average test, applied over Y_{FOS} for all conditions in Figure 2, considering a p-value of 0.05 (data not presented), confirmed that the synthesis at 48°C and 50% (w/v) of sucrose are not statistically different between 18 and 24 h and also correspond to the highest FOS yield. However, at 24 h, the FOS fractional composition (ϕGF_n) is better than at 18 h. According to these results, the conditions for better FOS synthesis performance are: temperature of 48°C, reaction time of 24 h and initial sucrose concentration of 50% (w/v).

Figure 3 shows the composition profiles at these synthesis conditions, for the residual components and total FOS (Fig.3.a) and FOS fractional components (Fig.3.b) during synthesis time. From Figure 3.a it can be observed that the sucrose concentration is quickly reduced and total FOS concentration has a maximum at 24 h, decreasing afterwards due to the increasing glucose concentration that inhibits FOS synthesis, so that the enzyme hydrolytic activity starts gradually prevailing in the process, and consequently glucose and fructose concentrations increase with time. Figure 3.b shows the FOS fractions evolution during time reaction, which profiles are in accordance with the known kinetics for this enzyme (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010 and 2011), which predicts large amounts of 1-kestose (GF₂) at the beginning of the reaction, and amounts of GF₃ and GF₄ that are gradually accumulated during the reaction time. However, after a long period of reaction, or with larger enzyme concentration, the residual fructose increases with time and GF₂ and GF₃ decreases.

According Park and coworkers (1999) and Kim and coworkers (1998), two enzyme with transfructosylation activity from two different strains of *B. macerans* were capable to produce exclusively GF₄ (Park *et al.*, 1998) and GF₅ (Kim *et al.*, 1998), each one with a total sucrose conversion of respectively 42.3% and 33% (w/v), without formation of GF₂ nor GF₃, what was expected according to the kinetics of these enzymes, which follows a specific chain reaction: $GF_n + GF_n = GF_{n-1} + GF_{n+1}$ (Duan *et al.*, 1994). Nemukula and colleagues (2009), working with the fructosyltransferase of *A. aculeatus* reported that the highest compositions of nystose (GF₃) and 1^F-fructofuronosyl-nystose (GF₄) were obtained at 50°C, but for 1-kestose (GF₂) the better temperature was 60°C, which was the temperature defined as the optimum, considering that it aids in preventing microbial contamination, decreases viscosity and increases mass transfer rates. These authors proposed the following optimum synthesis conditions: sucrose at 60% (w/v), 20 U/mL of free enzyme, 60°C, 4 h of synthesis and pH 5.6; these conditions led to the maximum 1-kestose (GF₂) concentration of 68.81%. In this present work, however, the GF₂ composition reached 61% under optimized conditions, as shown in Table 5.

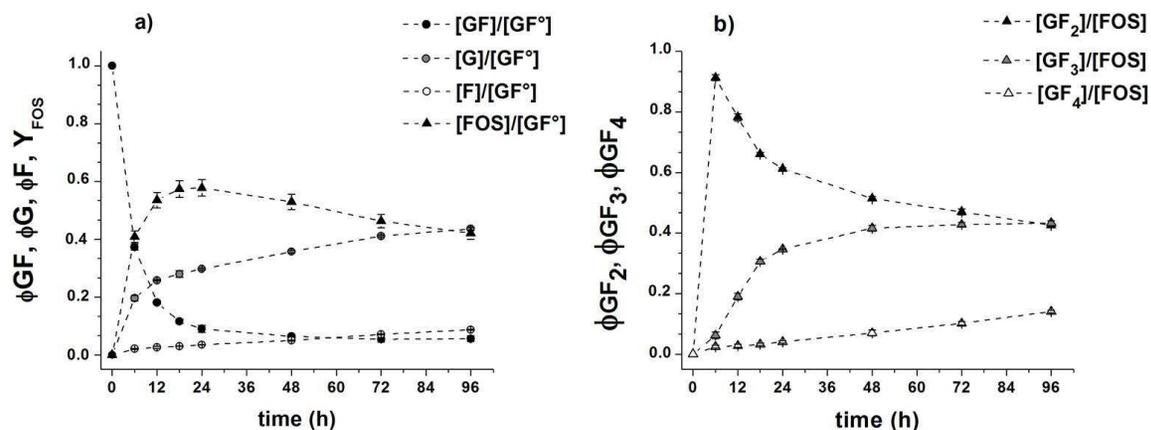


Figure 3: Time courses of FOS synthesis for: **a)** residual composition of: sucrose (ϕ_{GF}) – black circle, glucose (ϕ_G) – gray circle, and fructose (ϕ_F) – white circle, and FOS yield (Y_{FOS}) – black triangle; and **b)** FOS composition: 1-kestose (ϕ_{GF_2}) – black triangle, nystose (ϕ_{GF_3}) – gray triangle, and 1^F-fructofuranosyl-nystose (ϕ_{GF_4}) – white triangle. The syntheses were carried out with 50% (w/v) of initial sucrose concentration at 48°C, 20 U_i/mL and pH 6.0. Standard errors values ranged from 0.003 to 0.013.

Table 5: Comparison between non optimized and optimized FOS production processes with immobilized and partially purified fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10.

	Synthesis parameters					Yield and FOS composition				FOS Productivity (g/L.h)
	T (°C)	pH	[GF ⁰] (% w/v)	[E] (U _i /mL)	Time (h)	Y _{FOS}	ϕ_{GF_2}	ϕ_{GF_3}	ϕ_{GF_4}	
Optimized	48	6.0	50	20	24	0.58 ± 0.01	0.61 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.041 ± 0.003	12.05
Non Optimized	50	6.0	50	6	96	0.55 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.041 ± 0.002	2.86
		4.5				0.51 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.046 ± 0.004	2.66

The data for FOS production under optimized and not optimized conditions are put together in Table 5 for comparison. As it can be seen, the optimum reaction time reduced from 96 h to 24 h, while the immobilized enzyme activity was increased about 3 times resulting in an increase of about 4 times in FOS productivity (12.05 g/L.h under optimized conditions). It can also be seen that the reduction of 2°C in the synthesis temperature and the selection of pH 6.0 contributed to the improvement the reaction, leading to higher yields (from 5 to 14% of increase), higher content of GF₃ (from 40 to 59% of increase), while the GF₄ composition remained almost unchanged. As comparison, Sangeetha and colleagues (2005(b)) reported 53% of FOS yield from a recycling culture with pellets of *A. oryzae* using 60% sucrose, 55°C, pH 5.15 and 15 U/mL; Tanriseven and Aslan (2005) obtained 57% of sucrose conversion into FOS after 24 h, with a commercial enzyme preparation containing fructosyltransferase activity, immobilized covalently onto Eupergit C, in reaction carried out at 60°C, 60% of initial sucrose concentration, pH 5.5. With the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. under optimized conditions (48°C, 50% of sucrose, pH 6.0, 20 U/mL and 24 h) it was possible to obtain a FOS yield of 58%, as presented in this work.

According to the literature (Kim *et al.*, 1998), the average composition of FOS in reactive medium is 25-30% of GF₂, 10-15% of GF₃ and 5-10% of GF₄ with 25-30% of glucose released in the medium. The results of this work (Table 5) are quite similar to the above described, being about 35% of GF₂, 20% of GF₃ and 2% of GF₄ with a residual of glucose of about 30%. These results confirm the great potential of the immobilized extracellular fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10.

5- Discussion

The optimization of fructooligosaccharides synthesis from sucrose with fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, partially purified and immobilized in niobium, led to an increase in the conversion of sucrose into FOS, an improvement in FOS composition and reduced the synthesis time from 96 h for 24 h, increasing the productivity by a factor higher than 4. These improvements can be very important concerning large scale production, mainly when the reuse of the immobilized enzyme is considered. The

application of two sequential (2^{4-1}) Fractional Factorial Design allowed reliable analysis of effects and significance of the factors, which were temperature, pH, initial sucrose concentration and immobilized enzyme activity. The validation studies provided adequate information regarding the reaction time, so that undesirable accumulation of residual fructose in the medium could be avoided.

In conclusion, the application of the methodology of factorial design was efficient and met the initial optimization proposals: the study of the effects on FOS synthesis and the improvement of the process results. Therefore the use of a partially purified enzyme led to conversions of sucrose into FOS equivalent to the commercially available process, which stresses the great potential of this niobium supported enzyme.

6- Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (*Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*; São Paulo - Brazil).

7- Nomenclature

[E]	Immobilized enzyme activity (U_i/mL)	R_{TF}	Transfructosylation to hydrolysis activities ratio (U_i/U_{iH})
[F]	Fructose concentration (g/L)	U_i	Immobilized transfructosylation activity ($\mu mol/min.g$ of support)
F_T	Transferred fructose ($\mu mol/min$)	U_{iH}	Immobilized hydrolyzing activity ($\mu mol/min.g$ of support)
FOS	Fructooligosaccharides concentration (g/L)	Y_{FOS}	FOS yield ($[FOS]/[GF^\circ]$)
FTase	Fructosyltransferase	ϕF	Fraction of fructose related to initial sucrose concentration ($[F]/[GF^\circ]$)
G	Glucose concentration ($g/L, \mu mol/min$)	ϕG	Fraction of glucose related to initial sucrose concentration ($[G]/[GF^\circ]$)
GF	Sucrose concentration (g/L)	ϕGF	Fraction of sucrose related to initial sucrose concentration ($[GF]/[GF^\circ]$)
GF°	Initial sucrose concentration ($g/L, \% w/v$)	ϕGF_2	Fraction of 1-kestose related to total FOS amount ($[GF_2]/[FOS]$)
GF_2	1-kestose concentration (g/L)	ϕGF_3	Fraction of nystose related to total FOS amount ($[GF_3]/[FOS]$)
GF_3	Nystose concentration (g/L)	ϕGF_4	Fraction of 1 ^F -fructofuranosyl-nystose related to total FOS amount ($[GF_4]/[FOS]$)
GF_4	1 ^F -fructofuranosyl-nystose concentration (g/L)		
GF_5	1 ^F (1- β -D-fructofuranosyl) ₅ -sucrose concentration (g/L)		
k	Number of factors		
n	Polymerization degree		
Nb	Niobium		
p	p-value		
RS	Reducing sugars		

8- References

- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (3), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** International Journal of Food Engineering, 6 (3), 9, DOI 10.2202/1556-3758.1894.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2011). **Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Catalysis Science & Technology, DOI 10.1039/c0cy00059k.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Anjun, M.F., Tasadduq, I. & Al-Sultan, K. (1997). **Response surface methodology: A neural network approach.** European Journal of Operational Research, 101, 65-73.
- Baş, D. & Boyacı, İ.H. (2007). **Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology.** Journal of Food Engineering, 78, 836-845.
- Cairns, A. (1995). **Effect of enzyme concentration on oligofructan synthesis from sucrose.** Phytochemistry, 40 (3), 705-708.
- Chen, W. & Liu, C. (1996). **Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*.** Enzyme and Microbial Technology, 18 (2), 153-160.
- Duan, K.J., Chen, J.S. & Sheu, D.C. (1994). **Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose.** Enzyme and Microbial Technology, 16, 334-339.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A. & Roberfroid, M.B. (2004). **Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.** Nutrition Research Reviews, 17, 259-275.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995). **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of prebiotics.** The Journal of Nutrition, 125 (6), 1401-1412.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.
- Hidaka, H., Hirayama, M. & Sumi, N. (1988). **A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611.** Agricultural Biological Chemical, 52 (5), 1181-1187.
- Kim, B.W., Choi, J.W. & Yun, J.W. (1998). **Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme.** Biotechnology Letters, 20 (1), 1031-1034.
- Kono, T., Yamaguchi, G. & Hidaka, H. (1994). **Fructose transferring enzyme absorbed on granular carrier for production of fructooligosaccharides.** United States patent US 5,314,810.
- Kuhn, R.C. & Maugeri, F. (2010). **Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column.** New Biotechnology, 27 (6), 862-869.
- Kuhn, R.C. & Maugeri, F. (2010). **Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns.** Journal of Chromatography B, 878 (22), 2023-2028.
- Maiorano, A.E., Picooli, R.M., Silva, E.S. & Rodrigues, M.F.A. (2008). **Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pre-biotics.** Biotechnology Letters, 30, 1867-1877.
- Markosyan, A.A., Abelyan, L.A., Adamyan, M.O., Ekazhev, Z.D., Akopyan, Zh.I. & Abelyan, V.A. (2003). **Production of Fructooligosaccharides Syrup from Sucrose in Combination with Palatinose and Trehalose.** Applied Biochemistry and Microbiology, 43 (4), 383-389.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2008). **Nueva tecnología para producir prebióticos.** Énfasis Alimentacion Latinoamerica, 9, 62-64.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico.** Brazil patent, PI 070683-1.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49 (1-6), 43-49.
- Maugeri, F., Hernalsteens, S., Barbosa, G.N.O. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Produção de fructooligosaccharídeos a partir de sacarose por enzima, imobilizada ou livre, extracelular de leveduras.** Brazil patent PI 0705359-2.

- Mysore, N.R.R., Shivakumara, M., Sangeetha, P.T., Prapulla, S.G. & Prakash, M. (2005). **Process for preparation of fructooligosaccharides (FOS)**. United States patent US 2005/0069627 A1.
- Nemukula, A., Mutanda, T., Wilhemi, B.S. & Whiteley, C.G. (2009). **Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus***. Bioresource Technology, 100, 2040-2045.
- Park, J.P., Bae, J.T. & Yun, J.W. (1999). **Critical effect of ammonium ions on the enzymatic reaction of a novel transfructosylating enzyme for fructooligosaccharides production from sucrose**. Biotechnology Letters, 21, 987-990.
- Passos, L.M.L. & Park, Y.K. (2003). **Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos**. Ciência Rural, 33 (2), 385-390.
- Plou, F.J., Segura, A.G.D. & Ballesteros, A. (2007) In: Polaina, J. & MacCabe, A.P., Eds. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. The Netherlands, Springer, 141-157.
- Rodrigues, M.I. & Iemma, A.F. (2009). **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 2nd ed. Campinas, Casa do Pão.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2005(a)). **Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides**. Trends in Food Science Technology, 16, 442-457.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2005(b)). **Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202**. Process Biochemistry, 40, 1085-1088.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2004). **Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR202 and *Aureobasidium pullulans* CFR77**. Process Biochemistry, 39, 753-758.
- Stewart, M.L., Timm, D.A. & Slavin, J.L. (2008). **Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system**. Nutrition Research, 28, 329-334.
- Suzuki, N., Aiba, Y., Takeda, H., Fukumori, Y. & Koga, Y. (2006). **Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria**. Bioscience and Microfla, 25 (3), 109-116.
- Tanriseven, A. & Aslan, Y. (2005). **Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides**. Enzyme and Microbial Technology, 36, 550-554.
- Vaňková, K. & Polakovič, M. (2010). **Optimization of single-column chromatographic separation of fructooligosaccharides**. Process Biochemistry, 45, 1325-1329.
- Zheng, S., Steenhout, P., Kuiran, D. *et al.* (2006). **Nutritional support of pediatric patients with cancer consuming an enteral formula with fructooligosaccharides**. Nutrition Research, 26, 154-162.
- Zuleta, A. & Sambucetti, M.E. (2001). **Inulin Determination for Food Labeling**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 4570-4572.
- Yun, J.W. (1996). **Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and application**. Enzyme and Microbial Technology, 19, 107-117.

**Characterisation of Biocatalysts Immobilized in a New
Inorganic Solid Support**

Resumo

Dentre os estudos conduzidos no programa de Doutorado “Sandwich” em Lisboa (Portugal) no Instituto Superior Técnico (IST) com a inulinase e invertase comerciais e immobilizadas em liga de nióbio e grafite, estão os resultados obtidos com a caracterização dos biocatalisadores. Seguindo a mesma metodologia padrão de adsorção empregada com a frutossiltransferase (FTase) – Capítulo 2 – inulinase de *Aspergillus niger* e invertase de *Saccharomyces cerevisiae* foram immobilizadas e caracterizadas quanto ao efeito do substrato, pH e temperatura sobre a atividade enzimática livre e immobilizada. Para ambas as enzimas, os pontos de máxima atividade foram observados em pH 4,5, 60°C e 500 g/L de sacarose. Considerando a atividade enzimática oferecida à immobilização, a eficiência obtida com a inulinase foi de 72% e com a invertase de 30% sendo que com relação à proteína houve aproximadamente 99% em ambos os casos de adsorção; a immobilização em nióbio, portanto, foi prejudicial às duas enzimas pois com a FTase essa eficiência é em torno de 97% (Capítulo 2). Com a inulinase, a immobilização não afetou consideravelmente os perfis da atividade relativa para as diferentes condições de concentração de sacarose e pH, no entanto, a enzima immobilizada apresentou um perfil de atividade relativa em função da temperatura muito mais abrupto que a enzima livre. A constante de inibição pela sacarose (K_i) foi estimada em torno de 560 g/L para a inulinase livre e immobilizada, a energia de ativação (E_a) e a energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) foram estimadas para a enzima immobilizada como 41,41 e 130,94 kJ/mol. Com a invertase, a immobilização causou uma diferenciação mais pronunciada entre os perfis de atividade relativa em função do pH; K_i foi estimada como 450 g/L e as energias E_a e E_{ad} após a immobilização como 36,12 and 244,77 kJ/mol. Para a hidrólise da inulina a immobilização da inulinase reduziu as produtividades específicas ($\mu\text{g}/\text{U}\cdot\text{h}$) dos açúcares redutores ($\text{Pr}_{(G+F)}$) obtidos em cerca de 92%; com a invertase immobilizada $\text{Pr}_{(G+F)}$ foi aumentado em 3 vezes com inulina de Dhalia e reduzida em 1,6 vezes com a inulina de chicória. Tendo sacarose como substrato, foi possível observar atividade de transfrutossilção por ambas as enzimas, mas em proporções muito menores que com a FTase, assim como os valores de $\text{Pr}_{(G+F)}$ obtidos com a inulinase e invertase foram muito maiores do que com a FTase. A immobilização em nióbio da inulinase e invertase não grandes diferenciações de atividade, estabilidade etc. como observado com a FTase mas forneceram dados importantes para a aplicação deste suporte até o momento pouco conhecido para immobilização de enzimas.

Characterisation of Biocatalysts Immobilized in a New Inorganic Solid Support

E. Aguiar-Oliveira^a, *P. Fernandes*^b, *J. M. S. Cabral*^b & *F. Maugeri*^a

^a Faculty of Food Engineering (FEA), Dept. of Food Eng. (DEA), University of Campinas (UNICAMP); Campinas – São Paulo, Brazil.

^b Institute for Biotechnology and Bioengineering (IBB), Centre for Biological and Chemical Engineering (CEBQ), Technical University of Lisbon (IST), Lisbon, Portugal

Abstract

A new support for enzyme immobilization, a niobium-graphite alloy, have been tested with the fructosyltransferase (FTase) from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 and, due to its promising results presented, was additionally tested with two commercial enzymes: invertase from baker's yeast and inulinase from *Aspergillus niger*, and the results about the effect of pH, sucrose concentration and temperature over enzymatic activity were compared to those obtained with the FTase. The efficiency for immobilization, considering enzymatic activity, was about 30 % for invertase and 72 % for inulinase, inferior to those of 98 % obtained with the FTase. There were no significant changes concerning the characteristics of the two free enzymes, compared with the immobilized ones. The hydrolysis of inulin (at 5% w/v) by the inulinase was affected by immobilization; on the other hand, it was favourable for invertase over inulin from *Dhalia* tubers. The transfructosylating activity over sucrose at (50% w/v) of both enzymes was also affected after immobilization.

Keywords: Fructosyltransferase; Immobilization; Inulin hydrolysis; Inulinase; Invertase; Niobium; Sucrose; Transfructosylation.

1- Introduction

Food processing is one of the areas where the use of enzyme technology is well implemented, and this trend is continuously gaining momentum. Within this scope, applications for sugar processing are among the most widespread (Panesar *et al.*, 2010). The immobilization of enzymes allows the continuous use of a biocatalyst and also permit the efficient separation and/or removal of the biocatalyst from the reactive medium, avoiding an additional downstream step to the process (van-Belien & Li, 2002).

Invertase (EC 3.2.1.26) is so named because of its capability to produce inverted sugar (Dipasquale *et al.*, 2009) and is largely applicable in industrial process (Panesar *et al.*, 2010). Some invertases present transfructosylating activity in sucrose concentrations over 200 g/L, as observed by Fernandez *et al.* (2007). Invertase from baker's yeast (from *Saccharomyces cerevisiae*), commercially available, was classified by Akardere *et al.* (2010) as homogeneous and with molecular mass of 52 kDa. According to these researchers, *S. cerevisiae* is capable of producing both intracellular and extracellular invertase, and its weight typically varies from 50 to 300 kDa.

Fructans are fructose polymers with degree of polymerisation (n) between 3 and 60 with only one terminal glucose (Zuleta & Sambucetti, 2001). Inulin hydrolysis (a type of fructan) can be performed by endoinulinase or exoinulinases (or both), considering that, the fungus *Aspergillus niger* presents both enzymes (Gill *et al.*, 2006; Goosen *et al.*, 2008). These two inulinases were purified, and their molecular weights were determined as 80 kDa (exoinulinase) and 63 kDa (endoinulinase) by Campos (2000). A commercial preparation of Novozyme[®] containing inulinase (EC 3.2.1.7) from *A. niger* was evaluated for sucrose hydrolysis by Catana and co-workers (2005); in a very interesting work, Roy and Gupta (2004) consider the oligosaccharides as 'reversion products' obtained from the starch hydrolysis and proposed a mixture of two individually immobilized enzymes (pullulanase and glucoamylase) in order to increase the glucose and consequently, the reducing sugars, concentrations from gelatinized starch.

The fructooligosaccharides (FOS), also a type of fructans, are oligomers (GF_n) composed by "n" fructosyl groups (2 < n < 7) linked in the β-2,1 position having a terminal

glucose (Dipasquale *et al.*, 2009; Markosyan *et al.*, 2003). According to the polymerization degree (n), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) are the most common components in FOS mixtures. These oligosaccharides have been classified as prebiotics sugar (Gibson & Roberfroid, 1995) and have good sweetness properties and have been used for foodsuffs among several other benefits (Hirayama, 2002). There are no ideal composition of FOS, some researchers believe that FOS with higher polymerization degree (n) are more beneficial, as they are resistant against microbial fermentation (Stewart *et al.*, 2008), other suggested that 1-kestose (GF₂) has better prebiotic effect compared to the nystose (GF₃) (Suzuki *et al.*, 2006).

The niobium support, for enzyme immobilization, consists of a synthetic alloy of niobium, containing 95% of niobium and 5% of graphite. Niobium is a mineral in abundance in the world, mainly in Brazil, which is the world largest niobium producer in the world (for further information: <http://www.cbmm.com.br/english/index.html>; last consult on Nov/7th/2010). One of its main characteristics is to be negatively charged, so that it tends to promote the phenomenon of partition of protons by concentrating on its surface cations, resulting in a pH of the enzymatic microenvironment different from the pH from dispersion medium (Moskovitt & Srebnik, 2005; Trevan, 1980). Many studies have been conducted with it and there are many applications for this ore (Bordingnon *et al.*, 2011), however, its application as a support for enzyme immobilization is recent (Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2007). One of those few, yet representative examples of application, is the immobilization of fructosyltransferase (FTase), from *Rhodotorula* sp., a heterodimer with subunits from 74 and 125 kDa (Hernalsteens & Maugeri, 2008), in particles of niobium/graphite support (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010). It was reported a retention (immobilization efficiency) of nearly 99 % of total protein and 98 % of enzymatic activity offered for immobilization with maximum adsorption of 164 U_i (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010); the pH for maximum enzyme activity for free enzyme is 4.5 (Hernalsteens & Maugeri, 2008); for the immobilized enzyme, however, it was observed a second optimum point besides pH 4.5, *i.e.* the pH 6.0. The highest enzyme activity temperature was obtained with nearly 60°C at pH 4.5 and 63°C at pH 6.0 with the immobilized FTase. Additionally, the enzyme kinetics showed substrate inhibition over 600 g/L of sucrose, pH 4.5 and 6.0 (Aguiar-Oliveira &

Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010). Activation energy for denaturation (E_{ad}) of fructosyltransferase immobilized on niobium of 174.10 kJ/mol was calculated from Arrhenius plot for the temperatures between 47 and 51°C at pH 4.5. Concerning the free enzyme, at the same pH value and temperatures between 47 and 70°C, the E_{ad} value was 294.35 kJ/mol (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011). The kinetics parameters for the immobilized FTase were determined as: $V_{max} = 35$ g/L.h, $K_m = 383.81$ g/L and $K_i = 615.01$ g/L (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010). The FOS synthesis from sucrose with the immobilized FTase was optimized at the following conditions: 48°C, 50 % (w/v) of sucrose in 50 mM of sodium acetate buffer and pH 6.0, 24 h and 20 U_i/mL, resulting in a FOS yield of 0.58 (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011).

Given the promising results obtained with FTase immobilized in the niobium support (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011; Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011; Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010, Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010), the feasibility of application of using said support with other enzymes with relevance for commercial applications was assessed. Therefore, two commercially available enzymes, inulinase and invertase, were also immobilized and characterised in terms of pH, temperature and substrate concentration, aiming to establish the effect of immobilization on the enzymatic activity, sucrose and inulin hydrolysis and transfructosylating activity with sucrose as substrate.

2- Materials and Methods

2.1- Enzymes and Materials

Invertase from baker's yeast (from *Sacharomyces cerevisiae*, EC 3.2.1.26) and inulinase (from *Aspergillus niger*, EC 3.2.1.7) were purchased from Sigma[®], as a lyophilized powder and a solution, respectively. Two types of inulin were assayed with invertase and inulinase: one from Dahlia tubers, with a polymerisation degree (n) between 20 and 25 (Acros-Organic[®]), and another from chicory, with n = 10 (Cosucra[®]), according to the specifications of manufacturers. All other reagents were purchased according to local availability (Brazil and Portugal). The experiments with the FTase and the chromatographic analyses were carried out at the Laboratory of Bioprocess Engineering (DEA-FEA/UNICAMP, Brazil) and the experiments with the inulinase and invertase were performed at the

Bioengineering Research Group (CEBQ-IBB/IST, Portugal).

2.2- Immobilization by adsorption

The standard method for immobilization was by adsorption, and it has been described previously (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Maugeri & Aguiar-Oliveira, 2007). The dispersion medium for adsorption was sodium acetate buffer 50 mM (pH 4.5) for FTase, and sodium acetate buffer 100 mM (pH 4.5) for invertase and inulinase.

2.3- Characterization of the free and immobilized enzymes

The enzymatic activities of inulinase and invertase were determined according to the fructosyltransferase activity method (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008). Considering the free enzymes, 1 unit of enzymatic activity was defined for this study as 1 μmol of the reducing sugars - glucose and fructose (determined by Somogyi-Nelson methodology) - released in 1 min (U_F). For the immobilized enzymes, the enzymatic activity was determined per gram of immobilized biocatalyst, *i.e.* 1 μmol of reducing sugars released in 1 min per gram of biocatalyst ($U_I = U_F/\text{g}$). The characterization of the free and immobilized biocatalysts was performed by determining the enzymatic activity as a function of pH, temperature and substrate concentration. Data were expressed as relative enzymatic activity (free or immobilized), *i.e.* the ratio between the enzymatic activity in a specific condition and the highest enzymatic activity according to the conditions studied. Lowry methodology was used to determine the amount of proteins.

The hydrolysis/synthesis with inulinase and invertase were carried out at 50°C, with 15 mL of inulin 5 % (w/v) or sucrose 50 % (w/v), in sodium acetate buffer 100 mM, at pH 4.5, with 68.86 U_F/mL (free inulinase), 50.63 U_F/mL (free invertase), 1031.62 U_I/mL (immobilized inulinase) and 154 U_I/mL (immobilized invertase). The results were evaluated based on the percent composition of carbohydrates (Equation 1) in the reaction medium during the reaction time (and also the specific productivities, which corresponds to the total weight of products (reducing sugars = G+F or FOS = GF₂+GF₃+GF₄) per 1 unit of enzymatic activity (free or immobilized) per unit of time (Equation 2).

$$\%G, \%F \text{ and } \%FOS = ([\text{g/L}]^t / [\text{initial substrate concentration (g/L)}]^{t=0}) \cdot 100\% \quad (01)$$

$$\text{Pr}_{(G+F)} \text{ and } \text{Pr}_{FOS} = ([\mu\text{g/mL}] / [U/\text{mL}] \cdot [h]) = (\mu\text{g}/U \cdot h) \quad (02)$$

The original data, used to calculate the specific productivity for the fructosyltransferase, were obtained from two previous works: Alvarado-Huallanco & Maugeri (2010) with the free enzyme at 50°C, 5 mL of sucrose 50 % (w/v), in sodium acetate buffer 50 mM, at pH 4.5, and 6 U_{TF}/mL of enzyme activity, and Aguiar-Oliveira *et al.* (2011) with the immobilized enzyme at 48°C, 5 mL of sucrose 50 % (w/v), in sodium acetate buffer 50 mM, at pH 6.0, and 20 U_i/mL of enzyme activity.

The identification and quantification of the carbohydrates: sucrose (GF), glucose (G), fructose (F), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) and 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄), were carried out by ion exchange chromatography with a pulsed amperometric detector (HPLC-PAD) (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008); other FOS molecules with a degree of polymerization higher than 4 were not possible to be identified and quantified.

3- Results

3.1- Characterisation of the biocatalysts

3.1.a- Inulinase from *A. niger*

Considering the inulinase, in solution of sodium acetate buffer 100 mM, at pH 4.5, with 1434 U_F, an immobilized biocatalyst activity of 1032 U_I was obtained, representing a recovery of nearly 72 % of the initial enzymatic activity and 99 % of the total offered protein. Such fact shows that the way the enzyme was adsorbed affected its catalytic site. The effects of sucrose concentration, pH and temperature on the relative activity of free and immobilized enzymes are shown in Figure 1, with the maximum relative value of 1.0 at the optimal conditions.

In the Figures 1.a and 1.b, it is possible to observe that the effects of sucrose concentration and pH did not differ significantly between free and immobilized inulinases; the effect of temperature, however, was different (Figure 1.c). The points of highest activity for both enzymes were observed at 500 g/L of sucrose, pH 4.5, and 60°C.

From data presented in Figure 1.a, kinetic parameters were estimated, based on Lineweaver-Burke and Hofstee plots (Dixon & Webb, 1979; Panesar *et al.*, 2010), for the inulinase under the conditions assessed; the substrate inhibition constant (K_i) has an estimated value

of about 560 g/L. From Figure 1.a, it is clear that at sucrose concentrations higher than 600 g/L for both forms, free and immobilized enzyme, substrate inhibition is significant. Catana and co-workers (2005) also observed inhibition by sucrose concentration higher than 0.7 M (~250 g/L), with the same commercial preparation entrapped in calcium alginate, and also a change in the optimum pH, from 4.5 (free) to 4.0 (immobilized).

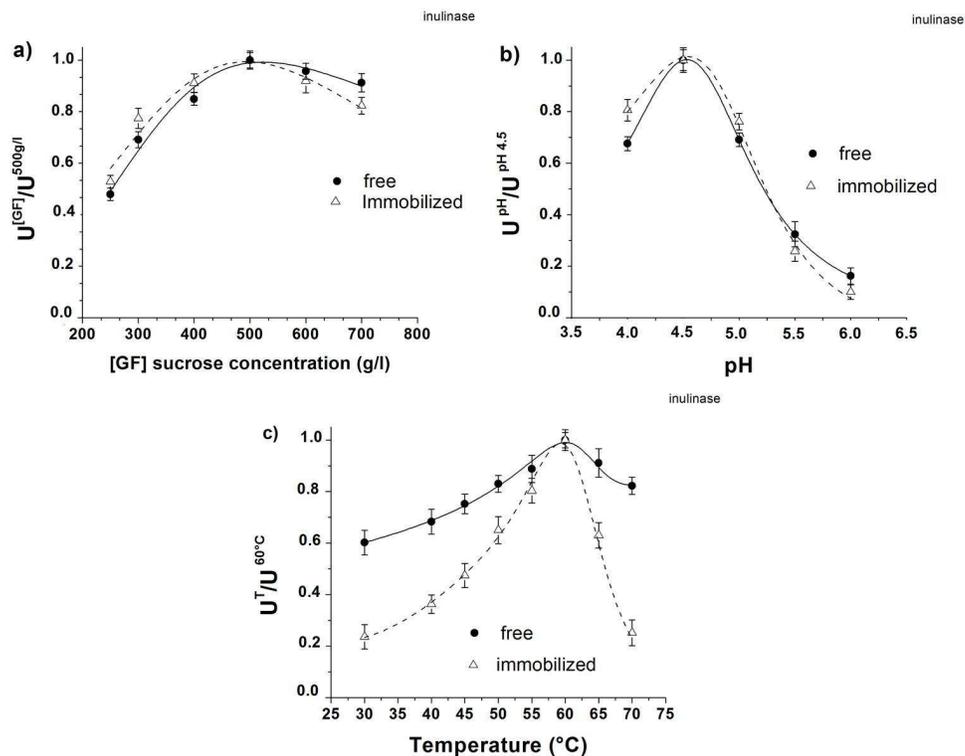


Figure 1: Effect of **a)** sucrose concentration ($U^{[GF]}/U^{500g/l}$), **b)** pH ($U^{\text{pH}}/U^{\text{pH}4.5}$) and **c)** temperature ($U^T/U^{60^\circ\text{C}}$) on inulinase from *A. niger*: free (filled symbols and lines) and immobilized (open symbols and dotted lines), in sodium acetate buffer 100 mM.

The effect of temperature on inulinase (Figure 1.c) shows differences between the free and immobilized form. The immobilized enzyme was more affected by the temperature, either in low or high temperatures, while interestingly the maximum is reached at the same temperature. Considering data from Figure 1.c, activation energies (E_a) and denaturation energies (E_{ad}) were estimated (Dixon & Webb, 1979; Panesar *et al.*, 2010), for the free inulinase as 14.13 and 18.68 kJ/mol, respectively. For the immobilized inulinase, the values were of 41.41 and 130.94 kJ/mol, respectively. These data suggest that the free enzyme requires less energy (0.3 times) to be activated, while the immobilized enzyme

requires much more energy (7.0 times) to be denatured, which means that the immobilization is favourable to thermal stability. According to Santos *et al.* (2007) the activation energy (E_a) for the inulinase from *K. marxianus var. bulgaricus* in sodium acetate buffer was determined as 45.09 kJ/mol (free enzyme) and 42.04 kJ/mol (immobilized enzyme in alginate beads) and the denaturation energy (E_{ad}) were, respectively, 530.68 and 298.64 kcal/mol; Ettalibi and Baratti (2001) determined for a commercial preparation of inulinase from *A. ficuum* equally in sodium acetate buffer activation energy values of 29.4 kJ/mol (free enzyme) and 26 kJ/mol (immobilized enzyme in porous glass).

3.1.b- Invertase from baker's yeast (*S. cerevisiae*)

Considering the invertase, in solution of sodium acetate buffer 100 mM at pH 4.5 with 506 U_F , an immobilized biocatalyst activity of 154 U_I was obtained, representing a recovery of nearly 30 % of the initial enzymatic activity and 98 % of the total offered protein. Such fact shows that, as for inulinase, the absorption on niobium also affects invertase activity, but the effect is more noticeable with the latter enzyme. Invertase immobilization in modified chitin (Kotwal & Shankar, 2009) allowed for a recovery of 68% of the initial enzymatic activity, along with an increase of 5°C in its optimum temperature.

Figure 2 shows the free and immobilized invertase characterization, based on the relative activity, with the maximum relative value of 1.0 at the optimal conditions.

In Figure 2.a it can be seen that maximum activity is observed at 500 g/L of sucrose concentration, with inhibition more noticeable than for inulinase (Figure 1.a), for sucrose concentrations above this value. As for temperature and pH, maximum activity is observed at 60°C and 4.5, respectively, as observed for inulinase (Figure 1).

Kinetic parameters were estimated for invertase, using data from Figure 2, as it was carried out with the inulinase: the substrate inhibition constant (K_i) was estimated as approximately 450 g/L; the activation (E_a) and denaturation (E_{ad}) energies for free invertase were estimated as 53.29 and 149.77 kJ/mol, respectively, and for the immobilized invertase as 36.12 and 244.77 kJ/mol, respectively. These data suggest that the free invertase requires more energy (1.5 times) than the immobilized one for activation, and for immobilized enzyme, the energy for denaturation is higher (1.6 times) than the one for free enzyme,

again suggesting that the immobilization in niobium support increases the thermal stability. Bergamasco *et al.* (2000) and Bassetti *et al.* (2000), working with the same commercial invertase in sodium acetate buffer, determined the activation and deactivation energies, respectively, for the free enzyme as 21.9 and 301.45 kJ/mol and for the immobilized enzyme in controlled pore silica as 20.68 and 347.92 kJ/mol.

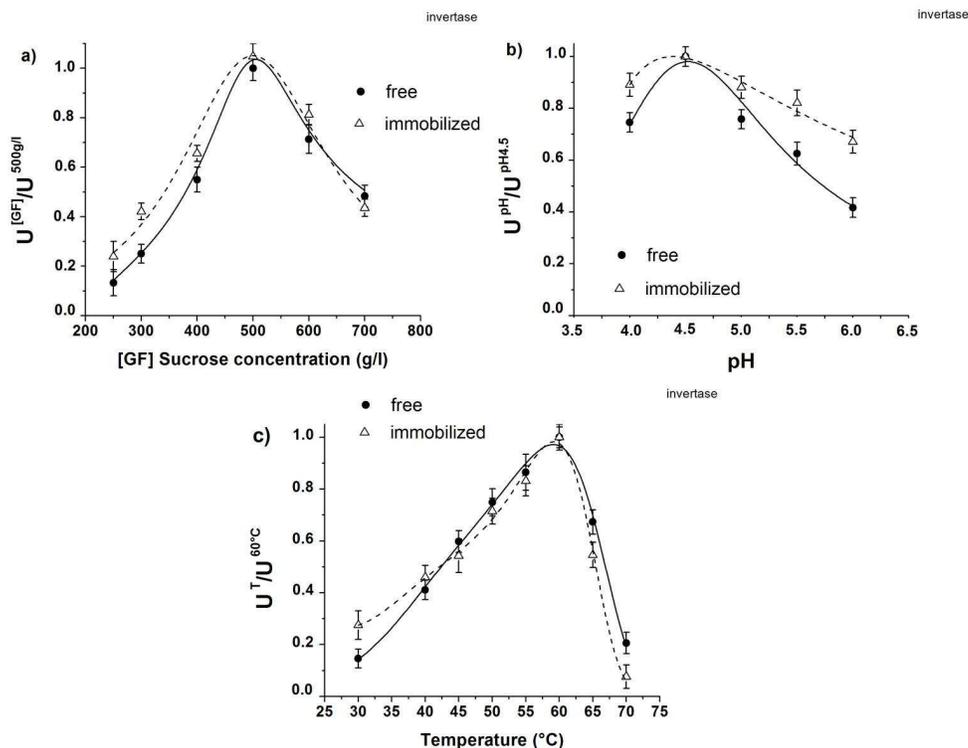


Figure 2: Effect of **a)** sucrose concentration ($U^{\text{GF}}/U^{500\text{g/l}}$), **b)** pH ($U^{\text{pH}}/U^{\text{pH}4.5}$) and **c)** temperature ($U^{\text{T}}/U^{60^\circ\text{C}}$) on invertase from *S. cerevisiae*: free (filled symbols and lines) and immobilized (open symbols and dotted lines), in sodium acetate buffer 100 mM.

Gopinath and Sugunan (2006) observed that an invertase from baker's yeast, adsorbed on acid montmorillonite, presented an abnormal value of K_m , 14.5 times higher than with the free invertase. The explanation was that some possible changes in native conformation can occur upon immobilization. The phenomenon of broadening the pH profile effect, after being immobilized in negatively charged supports, is quite common, as shown in the study of Sanjay and Sugunan (2006) with inulinase adsorbed on montmorillonite K-10, where an increase in optimum pH was also observed. Figure 2.b shows that after immobilization, however, the immobilized invertase presented higher

relative activities than free invertase, despite the relatively low efficiency of immobilization related to the enzymatic activity mentioned before.

3.2- Hydrolysis of inulin

Two types of inulin with different degrees of polymerisation (n) were selected as substrates for hydrolysis reactions with inulinase and invertase in free and immobilized forms. The percent compositions and specific productivities are shown in Table 1. Sucrose was identified and quantified (less than 1% w/w) only with the immobilized invertase with both inulin types at the first 6 h of reaction (data not presented). For all conditions evaluated several others chromatographic picks were observed with retention times higher than the GF₄. The percent composition of glucose (%G) is always lower when compared to fructose (%F) as presented in Table 1, since the inulin contains much more fructose molecules than glucose.

With the inulin from Dhalia tubers, all percent compositions presented in Table 1 were increased from 24 to 72 h; considering the percent composition of fructose (%F), free invertase presented the highest increase (2.5 fold), but with the immobilized inulinase the highest values for %F was obtained after 72 h of reaction (45.15%), followed by the immobilized invertase (44%). Probably because of the highest degree of polymerization (about 2 times higher than with the inulin from chicory) the percent compositions of FOS (%FOS) was basically composed by GF₄, except when free invertase was used, where GF₃ and GF₄ were observed from 48 to 72 h; with the immobilized invertase none of the three FOS were obtained but the fructose percent composition increased almost 1.5 times throughout the reaction. For comparison, with a partially purified (exo- and endo-) inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817 covalently immobilized onto a porous cellulose derivative and in a packed-bed column reactor (Nakamura *et al.*, 1995), it was possible to completely hydrolyse the inulin from Dhalia tubers (5 % w/v) over 45 days of continuous operation to a mixture of 97% of fructose and 3% of glucose.

With the inulin from chicory, the percent compositions of fructose (%F) decreased (between 4 and 9%) along time, except for the immobilized invertase, where (%F) increased around 6% and for free inulinase, where (%F), remained practically the same.

Table 1: Percent compositions of glucose (%G), fructose (%F) and FOS {GF₃+GF₄} (%FOS) and specific productivities of reducing sugars ($\mu\text{g}_{(G+F)}/\text{U}\cdot\text{h}$) with inulinase from *A. niger* and invertase from *S. cerevisiae*, free and immobilized on niobium with two different inulins as substrate: from Dhalia tubers, with a degree of polymerization (n) of 20 < n < 25, and from chicory with n = 10.

Substrate	Inulin from Dhalia tubers initial concentration: 50 g/L														
	24 h					48 h					72 h				
Time	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}
Free Inulinase	3.61	38.15	12.64	0.14 ^b	0.044	3.93	38.44	6.41	0.15 ^b	0.023	5.79	40.11	4.63	0.16 ^b	0.016
Free Invertase	0.34	1.83	0.89	-	-	0.44	2.92	0.69	0.45 ^a	0.092	0.54	4.66	0.71	0.44 ^a	0.071
Immobilized Inulinase	3.08	44.43	0.96	0.24 ^b	0.005	3.34	44.09	0.48	0.25 ^b	0.003	3.63	45.15	0.33	0.27 ^b	0.002
Immobilized Invertase	1.40	30.00	4.25	-	-	2.80	38.50	2.79	-	-	4.40	44.00	2.18	-	-
Substrate	Inulin from chicory initial concentration: 50 g/L														
	24 h					48 h					72 h				
Time	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}
Free Inulinase	9.91	40.27	15.18	0.22 ^b	0.066	10.07	39.97	7.57	0.20 ^b	0.030	10.42	40.49	5.13	0.22 ^b	0.022
Free Invertase	6.58	19.23	10.62	0.37 ^a	0.152	5.46	17.56	4.74	0.42 ^a	0.086	5.18	17.47	3.11	0.60 ^a	0.083
Immobilized Inulinase	11.39	47.72	1.19	0.29 ^b	0.006	10.64	46.04	0.57	0.30 ^b	0.003	10.17	45.65	0.38	0.32 ^b	0.002
Immobilized Invertase	7.40	31.60	5.28	0.75 ^a	0.102	7.83	32.16	2.71	0.81 ^a	0.055	8.22	33.63	1.89	0.81 ^a	0.037

^a GF₃+GF₄

^b GF₄

All percent compositions of FOS (%FOS) increased in time, especially with the free invertase (around 1.6 times) but the highest %FOS was achieved by the immobilized invertase after 72 h of reaction (0.81%). Similarly to the observations with inulin from *Dhalia* tubers as substrate, GF₄ was the only FOS obtained with inulinase and GF₃ and GF₄ was obtained with the invertase.

Considering the inulinase from *A. niger*, the specific productivity of reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) for both inulin types was relatively similar, but for the inulin with the highest degree of polymerisation, the values were slightly lower. The difference between free and immobilized inulinase is considerable, since the specific productivities are nearly 13 times higher with the free enzyme (Table 1). This must be due to the inulin macromolecule, which has a relatively hindered access to the sites of the immobilized enzyme. Considering the invertase from *S. cerevisiae*, the specific productivities in reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) were higher with the free invertase and inulin from chicory; with the immobilized invertase, the specific productivities for both types of inulin were similar. Comparing the two enzymes (Table 1), the highest $Pr_{(G+F)}$ values after 72 h were obtained by the free inulinase with both inulin types (5.13 and 4.63 $\mu\text{g}/\text{U}_F\cdot\text{h}$) followed by the free invertase and inulin from chicory (3.11 $\mu\text{g}/\text{U}_F\cdot\text{h}$). As an example, the immobilized inulinase with inulin from *Dhalia* tubers presented the highest percent composition of reducing sugars but the specific productivities ($Pr_{(G+F)}$) were smaller than the ones obtained with the enzyme in free form, which indicates that one unit of enzymatic activity can produce more reducing sugars in a free form.

Concerning the specific productivity of FOS (Pr_{FOS}), the highest FOS percent compositions (obtained with the immobilized invertase and the inulin from chicory) did not result as the highest Pr_{FOS} value, although, the highest values were obtained with the free invertase with both inulin types: from chicory – 0.083 $\mu\text{g}/\text{U}_F\cdot\text{h}$ – and *Dhalia* tubers – 0.071 $\mu\text{g}/\text{U}_F\cdot\text{h}$ – after 72 h (Table 1).

3.3- Hydrolysis of sucrose and transfructosylation activity

The reactions with sucrose as initial substrate were carried out with inulinase and invertase, aiming to investigate the capability of transfructosylation of these enzymes after immobilization; previous results, obtained with free (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) and immobilized fructosyltransferase (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011), performed at the same

conditions, were used to determine the percent compositions and specific productivities (Table 2). Having sucrose as initial substrate instead of inulin, the percent compositions of glucose (Table 2) are higher (Table 1). For the inulinase and invertase, %G and %F are roughly constant and have similar values since the first 6 h of reaction (data not presented), but with the fructosyltransferase the %G is much higher than the %F and both increase with reaction time, which is due to the much more stronger transfructosylation activity presented by the fructosyltransferase (the fructose released is used to produce FOS). Therefore, the highest percent compositions of reducing sugars (%G + %F) were obviously obtained with the inulinase and invertase due especially to the percent composition of fructose. Comparing invertase and inulinase, only with the immobilized invertase the percent composition of sucrose (%GF) was between 12 and 15%, with the inulinase no significant sucrose was detected since the earliest time of reaction (data not presented); with the free fructosyltransferase %GF reached 22% after 72 h of reaction (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) and with the immobilized form, %GF is less than 5% after 72 h (Aguiar-Oliveira, *et al.*, 2011).

De Paula *et al.* (2008) observed with the crude cell-free medium from a culture of *Kluyveromyces marxianus* containing inulinase entrapped in gelatin-water a sucrose conversion of 58.12% after 782 h in a fixed bed column reactor with 1% (w/v) of sucrose; Amaya-Delgado *et al.* (2006) with a commercial invertase from *Saccharomyces cerevisiae* covalently immobilized on nylon-6 tested in a fixed-bed reactor for sucrose hydrolysis resulted in reducing sugar concentration of, approximately, 279 and 410 g/L from 288 and 432 g/L of initial sucrose concentration, respectively.

For the inulinase from *A. niger*, the specific productivities of reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) were higher with the free enzyme (14–16 times higher than with the immobilized form). With the invertase from *S. cerevisiae* and sucrose as substrate, $Pr_{(G+F)}$ values were nearly 3.5 times higher with the free enzyme, compared to the immobilized one. In comparison to the inulinase, $Pr_{(G+F)}$ from free and immobilized invertase were higher than with inulinase, approximately 1.36 times higher with the free forms and 6 times higher with the immobilized forms. The specific productivity of reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) with

Table 2: Percent composition of glucose (%G), fructose (%F) and FOS {GF₂+GF₃+GF₄} (%FOS) and specific productivities of reducing sugars ($\mu\text{g}_{\text{(G+F)}}/\text{U.h}$) and FOS ($\mu\text{g}_{\text{FOS}}/\text{U.h}$) with free and immobilized inulinase from *A. niger*, invertase from *S. cerevisiae* and fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, with sucrose as substrate.

Substrate	Sucrose initial concentration: 500 g/L															
	Time	24 h					48 h					72 h				
		%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}	%G	%F	Pr _(G+F)	%FOS	Pr _{FOS}
Free Inulinase	50.92	48.20	299.91	0.87	0.50	50.45	48.43	149.58	11.17	0.30	50.03	48.33	99.19	16.42	0.31	
Free Invertase	50.76	48.89	410.06	0.35 ^a	0.27	50.29	49.27	204.83	0.44 ^a	0.18	49.97	49.54	136.49	0.49 ^a	0.13	
Free Fructosyltransferase	34.35	2.21	1269.53	53.85	1869.80	41.53	3.01	773.32	51.47	893.54	44.30	3.12	548.87	48.29	558.87	
Immobilized Inulinase	47.58	44.64	18.62	0.33	0.013	54.03	50.00	10.50	0.53	0.009	52.74	50.77	6.97	5.58	0.007	
Immobilized Invertase	44.24	39.63	113.46	0.83 ^b	0.21	45.01	39.93	57.45	1.20	0.16	46.69	39.24	38.75	1.20	0.13	
Immobilized Fructosyltransferase	29.69	3.45	345.28	57.85	602.56	35.68	5.02	211.96	52.93	275.67	41.13	7.13	167.57	46.35	160.92	

^a GF₃+GF₄

^b only GF₂

fructosyltransferase exceeded those obtained with inulinase and invertase. The highest values clearly suggests that the enzymatic activity of free and immobilized fructosyltransferase are capable to produce more reducing sugars than inulinase and invertase under the condition used for these assays.

It was possible to observe transfructosylation activity with both enzymes, inulinase and invertase, since small, in comparison to fructosyltransferase, yet increasing values of percent composition of FOS (%FOS), were obtained (Table 2). Between inulinase and invertase, after 72 h of reaction, the highest %FOS was obtained with free inulinase (16.42%) a value almost 3 times higher than with the immobilized form; for invertase, the immobilization lead to an increase of 2.4 times in %FOS. GF₂, GF₃ and GF₄ were detected before 24 h of reaction with free and immobilized inulinase; GF₂ was not detected with the free invertase at any time evaluated and GF₃ only after 48 h; with the immobilized invertase GF₃ and GF₄ were detected only after 48 h of reaction.

Comparatively, with the fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 with sucrose as initial substrate, the specific productivity of FOS (Pr_{FOS}) obtained with the free form was from 3.1 to 3.4 times higher than with the immobilized form (Table 2) meaning that the immobilization affected the transfructosylation activity; with free and immobilized forms, GF₂, GF₃ and GF₄ could be detected before 24 h of reaction; the percent compositions of FOS (%FOS) decrease as the reducing sugars, especially fructose, increase with time; at 24 h %FOS is more than 53 and 57% with the free and immobilized fructosyltransferase.

4- Conclusion

The results obtained with the new proposed support for enzyme immobilization, consisted of niobium (95%) and graphite (5%), showed that the enzymes studied so far, fructosyltransferase of *Rhodotorula* sp. LEB-V10 and commercial invertase and inulinase, have different affinities for the material. While the efficiency of immobilization considering the enzymatic activity was 98 % for fructosyltransferase, for the other two enzymes was 72 % and 31 % even if almost the total amount of protein was adsorbed on the support. By contrast, immobilization of invertase and inulinase did not change the points of maximum

activities for sucrose concentration, pH and temperature for both enzymes, inulinase and invertase; with the fructosyltransferase the effects were much more pronounced, especially with the pH (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) and temperature (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011) effects over the enzymatic activity after immobilization.

Considering the two kinds of inulin evaluated (both at 50 g/L) and comparing the results between inulinase and invertase after 72 h of reaction, the immobilization of inulinase increased the present compositions of reducing sugars (6% with the inulin from *Dhalia tubers* and 9% with the inulin from chicory) and FOS (1.66 and 1.45 times, respectively) but reduced the specific productivities of both in about 92% indicating that in a free form, one unit of enzymatic activity of inulinase produces much more reducing sugars and FOS. The immobilization of invertase increased the percent composition of reducing sugars in 9.3 and 1.8 times with the inulin from *Dhalia tubers* and chicory, respectively; it also affected drastically the production of FOS with not being able to obtain any FOS (GF₂, GF₃ or GF₄) with the inulin from *Dhalia tubers* and increased the %FOS in 1.35 times with the inulin from chicory; after the immobilization, the specific productivities with the inulin from *Dhalia* presented an increase of 3.07 times for the reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) and with the inulin from chicory, $Pr_{(G+F)}$ and Pr_{FOS} decreased in 1.6 and 2.2 times, respectively.

Considering sucrose as substrate, and regarding the specific productivity of FOS (Pr_{FOS}), the best performance among the three enzymes was presented by the free and immobilized fructosyltransferase. Additionally, it was possible to identify a transfructosylating activity with inulinase and invertase. The percent compositions of reducing sugars (%G + %F) obtained with the inulinase and invertase were higher than with the fructosyltransferase since the first hours of reaction maintaining almost the same percent composition throughout the reaction besides the small transfructosylation observed. For the fructosyltransferase the percent composition of glucose and fructose increases in time in accordance to the hydrolysis of sucrose and pre-formed FOS molecules which lead to a decreasing in %FOS. Considering the maximum production of FOS at 24 h with the fructosyltransferase, the immobilization lead to an increase of %FOS in 7% and a decrease of 1.1 times in the percent compositions of reducing sugars; the specific productivities were

also decreased in 3.7 and 3.1 times for $Pr_{(G+F)}$ and Pr_{FOS} , respectively. For the inulinase, the immobilization reduced the specific productivity of reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$) in 14 times and for Pr_{FOS} in 44 times (after 72 h), in a free form, inulinase is able to produce more reducing sugars and FOS from sucrose than invertase. Analysing the invertase, it was possible to observe that after the immobilization the specific productivity of reducing sugars decreased 3.5 times and the specific productivity of FOS remained the same (after 72 h).

In summary, considering the specific productivity of reducing sugars ($Pr_{(G+F)}$), the adsorption in niobium particles was not advantageous for the hydrolysis of inulin; the best three results were obtained with enzymes in a free form and only the fourth best result was obtained by immobilized invertase with inulin from Dhalia tubers (higher polymerization degree); however, if the specific productivity of FOS (GF_3+GF_4) is taken into consideration, the immobilization resulted in better results because the three best Pr_{FOS} values were obtained by immobilized invertase. If sucrose as substrate is considered, the best performances ($Pr_{(G+F)}$ and Pr_{FOS}) were obtained by fructosyltransferase; but between inulinase and invertase the immobilization did not improved the specific productivity of reducing sugars and FOS ($GF_2+GF_3+GF_4$) because the best results were obtained with free enzymes.

5- Acknowledgment

We would like to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil) and the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, Brazil) for financial support. We also thank the team from Bioengineering Research Group (BERG) from the Institute for Biotechnology and Bioengineering (IBB) at the Technical University of Lisbon (IST – Lisbon/Portugal) where inulinase and invertase were characterized.

6- Nomenclature

E_a	Activation energy (kJ/mol)	FOS	Fructooligosaccharides
E_{ad}	Activation energy for denaturation (kJ/mol)	G	Glucose
F	Fructose	GF	Sucrose
		GF_2	1-kestose

GF ₃	Nystose	U ^[GF]	Enzymatic activity at a certain sucrose concentration (μmol/min, μmol/g.min)
GF ₄	1 ^F -fructofuranosyl-nystose	U ^{500g/L}	Enzymatic activity at 500g/L of sucrose (μmol/min, μmol/g.min)
K _i	Substrate inhibition constant (g/L)	U ^{pH}	Enzymatic activity at a certain pH value (μmol/min, μmol/g.min)
K _m	Substrate saturation constant (g/L)	U ^{pH4.5}	Enzymatic activity at pH 4.5 (μmol/min, μmol/g.min)
n	Degree of polymerization	U ^T	Enzymatic activity at a certain temperature (μmol/min, μmol/g.min)
Pr _(FOS)	Specific productivity of FOS (μg/U.h)	U ^{60°C}	Enzymatic activity at 60°C (μmol/min, μmol/g.min)
Pr _(G+F)	Specific productivity of reducing sugars (μg/U.h)	V _{max}	Maximum velocity (g/L.min)
U _F	Unit of free enzymatic activity (μmol/min)	%G	Percentage composition of glucose
U _I	Unit of immobilized enzymatic activity (μmol/g.min)	%F	Percentage composition of fructose
U _i	Unit of immobilized fructosyltransferase activity (μmol/g.min)	%FOS	Percentage composition of FOS
U _{TF}	Unit of free fructosyltransferase activity (μmol/g.min)		

7- References

- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** International Journal of Food Engineering, 6 (3), art. 9, DOI 10.2202/1556-3758.1894, Available at <http://www.bepress.com/ijfe/vol6/iss3/art9>.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (3), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E.; Rodrigues, M.I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase.** Current Chemical Biology, In the press.
- Akardere, E.; Özer, B.; Çelem, E.B. & Önal, S. (2010). **Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast.** Separation and Purification Technology, 72 (3), 335-339, DOI 10.1016/j.seppur.2010.02.025.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp..** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Amaya-Delgado, L.; Hidalgo, M.E. & Montes-Horcasitas, M.C. (2006). **Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads.** Food Chemistry, 99, 299-304.
- Bassetti, F.J.; Bergamasco, R.; Moraes, F.F. & Zanin, G.M. (2000). **Thermal Stability and Deactivation Energy of Free and Immobilized invertase.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17 (4-7), 867-872.
- van-Belien, J.B. & Li, Z. (2002). **Enzyme technology: an overview.** Current Opinion in Biotechnology, 13 (4), 338-344.
- Bergamasco, R.; Bassetti, F.J.; de Moraes, F.F. & Zanin, G.M. (2000). **Characterization of Free and Immobilized Invertase Regarding activity and Energy of Activation.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17 (4-7), 873-880.
- Bordingnon, P.; Carneiro, T.; Tagusagawa, S. & Hulka, K. (2011). **Uses and End Users of Niobium.** Available at: <http://www.cbmm.com.br/english/index.html> section: Library/Uses and End Users of Niobium, last consult on Sept. 14th of 2011.
- Campos, F.R. (2000). **Estudo da adsorção de inulinasas em colunas com resinas de troca iônica: parâmetros experimentais e modelagem.** PhD Thesis, University of Campinas, Faculty of Chemical Engineering, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Catana, R.; Ferreira, B.S.; Cabral, J.M.S. & Fernandes, P. (2005). **Immobilization of inulinase for sucrose hydrolysis.** Food Chemistry, 91, 517-520.

- Dipasquale, L.; Gambarcorta, A.; Siciliano, R.A.; Mazzeo, M.F. & Lama, L. (2009). **Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359)**. *Extremophiles*, 13, 345-354.
- Dixon, M. & Webb, E.C. (1979). **Enzymes**. 3rd ed., Academic Press, New York.
- Ettalibi, M. & Baratti, J.C. (2001). **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinase from *Aspergillus ficuum***. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 596-601.
- Fernandez, R.C.; Ottoni, C.A.; da Silva, E.S.; Matsubara, R.M.; Carter, J.M.; Magossi, L.R.; Wada, M.A.; de Andrade Rodrigues, M.F.; Maresma, B.G. & Maiorano, A.E. (2007). **Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate**. *Applied Microbiology Biotechnology*, 75, 87-93.
- Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995). **Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of prebiotics**. *The Journal of Nutrition*, 125 (6), 1401-1412.
- Gill, P.K.; Manhas, R.K. & Singh, P. (2006). **Hydrolysis of inulin by immobilized thermoestable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus***. *Journal of Food Engineering*, 76, 369-375.
- Goosen, C.; van der Maarel, J.E.C. & Dijkhuizen, L. (2008). **Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A Hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity**. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 49-58.
- Gopinath, S. & Sugunan, S. (2006). **Enzymes immobilized on montmorillonite: comparison of performance in batch and packed-bed reactors**. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 8 (1), 3-9.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.*** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 589-596.
- Hirayama, M. (2002). **Novel physiological functions of oligosaccharides**. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (7), 1271-1279.
- Kotwal, S.M. & Shankar, V. (2009). **Immobilized invertase**. *Biotechnology Advances*, 27, 311-322.
- Markosyan, A.A.; Abelyan, L.A.; Adamyan, M.O.; Ekazhev, Z.D.; Akopyan, Z.I. & Abelyan, V.A. (2003). **Production of Fructooligosaccharides Syrup from Sucrose in Combination with Palatinose and Trehalose**. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43 (4), 383-389.
- Maugeri, F. & Aguiar-Oliveira, E. (2007). **Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico**. BR Patente: PI 0706083-1.
- Moskovitt, Y. & Srebnik, S. (2005). **Mean-field model of immobilized enzymes embedded in a grafted polymer layer**. *Biophysical Journal*, 89, 21-31.
- Nakamura, T.; Ogata, Y.; Shitara, A. & Nakamura, A. (1995). **Continuous Production of Fructose Syrups from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817**. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (2), 164-169.
- Panesar, P.S.; Marwaha, S.S. & Chopra, H.K. (2010). In: **Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications**. ed. Panesar, P.S.; Marwaha, S.S. & Chopra, H.K.; I.K. International Publishing House, New Delhi, India, Chapter 1, 1-43.
- de Paula, F.; Cazetta, M.L.; Monti, R. & Contiero, J. (2008). **Sucrose hydrolysis by gelatina-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus***. *Food Chemistry*, 111, 691-695.
- Roy, I. & Gupta, M.N. (2004). **Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and puluulanase entrapped individually in calcium alginate beads**. *Enzymes and Microbial Technology*, 34, 26-32.
- Sanjay, G. & Sugunan, S. (2006). **Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10**. *Food Chemistry*, 94, 573-579.
- Santos, A.M.P.; Oliveira, M.G. & Maugeri, F. (2007). **Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor desing**. *Bioresources Technology*, 98, 3142-3148.
- Stewart, M.L.; Timm, D.A. & Slavin, J.L. (2008). **Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system**. *Nutrition Research*, 28, 329-334.
- Suzuki, N.; Aiba, Y.; Takeda, H.; Fukumori, Y. & Koga, Y. (2006). **Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria**. *Bioscience and Microflora*, 25 (3), 109-116.
- Trevan, M.D. (1980). **Immobilized Enzymes – an Introduction and Applications in Biotechnology**. John Wiley & Sons, New York.

Zuleta, A. & Sambucetti, M.E. (2001). **Inulin Determination for Food Labeling**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4570-4572.

Effects of Lyophilization in the Catalytic Properties of the Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

Resumo

Devido ao grande potencial de aplicação industrial apresentado pela frutossiltransferase (FTase) extracelular e parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 para produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) avaliou-se os efeitos provocados pela liofilização da enzima na sua forma livre. A liofilização possibilitaria o estoque da enzima de forma mais estável, pois, em solução ou congelada, a perda de atividade por diversas reações química, físicas ou bioquímicas é alta; enzimas liofilizadas apresentam-se na forma de pó e estariam prontas para uso imediato. Dessa forma, com base na literatura disponível sobre liofilização de proteínas foram selecionados 11 compostos crioprotetores e eles foram empregados individualmente ou em composição de formulações com a enzima livre em diferentes diluições. A taxa de diluição da solução enzimática inicial demonstrou ser um fator importante pois soluções não diluídas ($\rho = 0,72 \text{ g/mL}$) resultaram em tortas liofilizadas de difícil moagem e dissolução, já com diluições de 1:6 e 1:2 v/v as tortas liofilizadas apresentaram características diferentes como rápida dissolução. A perda de atividade enzimática durante o processo de liofilização de soluções enzimática sem aditivos foi de 38% para a solução sem diluição, 27% para a solução diluída em 1:2 v/v e 80% de perda para a diluição de 1:6 v/v, no entanto, com a liofilização da FTase em tampão acetato de sódio 4 vezes mais concentrado que seu valor padrão obteve-se um aumento de 6 vezes na atividade enzimática por peso em comparação com a solução não liofilizada. A estabilidade de estocagem por 6 meses de liofilizados foi mais efetiva com a adição individual dos compostos do que sob formulações, sendo o sulfato de amônia a 2,5 % p/v com a solução enzimática não diluída o de melhor resultado com uma atividade relativa de estoque de 1,37; os liofilizados sem aditivos apresentaram perdas de atividade após o estoque de 34 a 18% e apresentaram boa manutenção da atividade de transfrutossililação após o estoque. Sob condições otimizadas de síntese, definidas no Capítulo 4, a liofilização demonstrou alterar a cinética enzimática especialmente ao resultar numa produção 3 vezes maior de GF₄ em relação à enzima não liofilizada. Estudos mais específicos sobre a conformação enzimática após a liofilização forneceriam informações complementares importantes. A FTase imobilizada em nióbio também foi liofilizada e seus resultados encontram-se no Capítulo 8.

Effects of Lyophilization in the Catalytic Properties of the Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

E. Aguiar-Oliveira & F. Maugeri

ABSTRACT

As a result of the great potential presented by the fructosyltransferase (FTase) from *Rhodotorula* sp. LEB-V10 for fructooligosaccharides (FOS) production, it was evaluated the lyophilization of this enzyme. Eleven crio-protectants additives were selected and analyzed individually and in formulation and the results showed, in general, lyophilized enzymes with higher enzymatic activity per gram. Lyophilization without additives from an enzymatic solution diluted in 1:2 (v/v) in sodium acetate buffer 200 mM and pH 4.5 presented the higher increase enzymatic activity per gram, almost 6.5-fold higher after liofilization. Additives used isolated such as CMC at 1.25% (w/v), mannitol, ammonium sulfate, sorbitol and xylitol at 2.5% (w/v) increased the enzymatic stability after 6 months. The effects of the additives isolated were better than in formulation. Lyophilization also affected the biocatalytic activity of FTase, especially by increasing GF₄ composition in almost 3-fold.

Keywords: FTase, Fructooligosaccharides Synthesis, Enzyme Lyophilization, Free Enzyme.

1- Introdução

Um ramo da biotecnologia denominado *white biotechnology* tem gerado muito interesse devido a sua frequente associação ao consumo reduzido de energia, descoberta de novas fontes de alimento e combustível em atendimento às demandas econômicas, políticas e sociais (Tang & Zhao, 2009).

Estudos conduzidos com a frutossiltransferase extracelular (FTase, EC 2.4.1.9) de *Rhodotorula* sp. LEB V-10 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008; Maugeri & Hernalsteens, 2007) livre ou imobilizada em um suporte sólido-ácido inorgânico (liga de nióbio e grafite), têm apresentado capacidade de aplicação industrial para produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) – um açúcar pré-biótico (Maiorano *et al.*, 2008; Sangeetha *et al.*, 2005) - ao promover, mesmo que parcialmente purificada (precipitação por etanol a 70%), conversões em torno de 58% da sacarose em FOS sob condições otimizadas com a enzima imobilizada em nióbio (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011). Em processos tradicionais utilizando a frutossiltransferase de fungos filamentosos as conversões variam de 50 a 70% com enzimas purificadas. A utilização da frutossiltransferase parcialmente purificada diminui o custo da produção de FOS e sua imobilização (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) favorece o uso contínuo industrial, portanto, os estudos aqui apresentados sobre a liofilização da frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 visam solidificar a viabilidade da utilização industrial desta enzima. Estudos cinéticos com esta mesma enzima imobilizada em nióbio (Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010) revelaram que tanto na forma purificada quanto parcialmente purificada as conversões da sacarose em FOS foram praticamente iguais entre si, fato este que por si justifica a aplicação da frutossiltransferase parcialmente purificada. Este presente trabalho tem por objetivo apresentar os resultados obtidos apenas com a liofilização da frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 na sua forma livre e liofilizada, os resultados referentes a liofilização da frutossiltransferase imobilizada em nióbio serão apresentados num artigo complementar a este (dados ainda não publicados).

1.1- Liofilização

A liofilização é um dos mais conhecidos processos de preservação empregados e consiste da remoção da água congelada de proteínas ou células em suspensão por sublimação (Aehle, 1990; Blanch & Clark, 1997; Cabral *et al.*, 1994; Chaplin & Bucke, 1990). Este processo é altamente indicado se há um valor comercial agregado à proteína em questão, porque facilita seu transporte, distribuição, estocagem, uso, etc. (tanto para fins farmacêuticos quanto alimentícios) mesmo sendo uma técnica de grande gasto energético e de tempo de preparo (Carpenter *et al.*, 1997; Fágáin, 1997; Partridge *et al.*, 1998; Roy & Gupta, 2004; Tang & Pikal, 2004). Métodos de conservação como, por exemplo, estocagem refrigerada em tampão fosfato (pH = 7,0) ou em soluções de etanol ou congelamento em presença de algum agente redutor (p.e. glutaminação) apresentam baixa vida de prateleira (*shelf-life*) e não são viáveis industrialmente (Kobayashi *et al.*, 1984) além de induzirem degradações do tipo: proteólise, química (p.e. deaminação ou oxidação) e/ou física (p.e. agregação e precipitação) e degradação (Carpenter *et al.*, 1997; Fágáin, 1997).

Diversos autores têm observado diferentes níveis de aumento da atividade e estabilidade de enzimas liofilizadas sob as mais diversas metodologias: Ru *et al.* (2001) relata o aumento em mais de 20.000 vezes a atividade biocatalítica de enzimas liofilizadas em presença de sais; Morgan e Clark (2004) obtiveram com uma xantina-oxidase liofilizada em presença de sais um aumento de sua atividade em 10 vezes; Sode e Yasutake (1997) ao liofilizarem uma glicose desidrogenase com sorbitol e, especialmente com trealose, conseguiram aumentar a estabilidade térmica em relação à condição não liofilizada; Wang e Mei (2007) aumentaram entre 9 e 14% a conversão de uma lipase liofilizada com ciclodextranas. Essa ativação e preservação da estrutura tridimensional após a liofilização podem ocorrer devido aos mais variados mecanismos, por exemplo: Lee e Dordick (2002) e Ru *et al.* (2001) afirmam que o uso de certos aditivos aumenta a solubilidade de solutos estabilizantes ao redor da proteína formando uma camada protetora; segundo Partridge *et al.* (1998), um processo eficiente de “reidratação” de enzimas ocorre quando as moléculas de água são retiradas de tal forma que as moléculas protéicas consigam manter sua estrutura tridimensional o mais intacta possível; Fágáin (1997) afirma que quanto mais uma enzima

conseguir manter o balanço iônico correspondente ao seu pH ótimo, melhor será a preservação de suas funções biocatalíticas.

Para reduzir o *stress* sofrido pela proteína são adicionados diversos compostos criou ou lipo-protetores (Gibson & Woodward, 1993; Kobayashi *et al.*, 1984; Hirakura *et al.*, 2004; Ru *et al.*, 2001; Roser, 1990). Alguns tampões após congelamento, tem seu pH alterado devido a uma mudança no pKa ou uma seletiva cristalização e precipitação de um sal menos solúvel. Os tampões mais inadequados seriam o fosfato e o pirofosfato que apresentam redução de 2-3 unidades no pH após congelamento e o Tris que apresenta um aumento no valor do pH de mesma magnitude (Carpenter *et al.*, 1997; Hirakura *et al.*, 2004; Williams-Smith *et al.*, 1977), nenhuma referência foi encontrada sobre o tampão acetato de sódio (tampão utilizado com a frutossiltransferase de *Rhodotorula sp.* LEB-V10) referente a este aspecto, apenas sobre os ótimos efeitos induzidos pelo sal acetato de sódio em altas concentrações como 98% (p/v) (Borole & Davison, 2008; Ru *et al.*, 2001). O mecanismo de ativação promovido por altas concentrações de sal parece envolver vários fatores como, mudanças na polaridade da enzima ou a cosmotropicidade de um sal (capacidade estabilizante), alguns autores sugerem o uso de tampões com concentrações mais elevadas de sal como 200 mM já que 98% (p/v) de um sal na formulação de um produto com aplicação na indústria de alimentos pode interferir na composição do produto final (Morgan & Clark, 2004; Partridge *et al.* 1998; Roy & Gupta, 2004; Ru *et al.*, 2001).

Drogas farmacêuticas e outros liofilizados protéicos frequentemente contêm em sua formulação glicose e/ou frutose (hexoses), sacarose (dissacarídeos) ou trealose (dissacarídeos não redutores) (Carpenter *et al.*, 1997; Gibson & Woodward, 1993; Kobayashi *et al.*, 1984) que elevam a densidade do meio reduzindo assim os impactos da desnaturação durante a liofilização ou remoção das moléculas de água. A sacarose é o açúcar mais recomendado em função do seu baixo custo em comparação com a trealose (Carpenter *et al.*, 1997), no entanto, para a frutossiltransferase de *Rhodotorula sp.* LEB-V10 provavelmente não seria recomendável utilizar na formulação do liofilizado sacarose, glicose ou frutose devido ao fato de serem substrato e sub-produtos da síntese de FOS, além do fato de que a frutossiltransferase apresenta inibição por estes três compostos em diferentes concentrações (Alvarado-Huallanco & Maugeri, 2010).

Embora Chaplin e Bucke (1990) defendam o uso de substratos nas formulações para liofilização, Carpenter *et al.* (1997) afirmam que mesmo sendo efetivos, estes aditivos tem propensão a degradar proteínas via reações de Maillard. Trealose tem sido muito utilizada devido ao seu alto efeito estabilizante e preservação da estrutura proteica (Carpenter *et al.*, 1997; Roser, 1990) em diferentes concentrações como: 100 mM (Carpenter *et al.*, 1997), 300 mM (Sode & Yasutake, 1997) e 0,05 a 20% (Roser, 1990).

O uso de agentes encorpantes (*bulking agentes*) como o manitol ou sorbitol (poliálcool hexahídrico) e xilitol (poliálcool pentahídrico) são recomendados em faixas de 2 a 10%, 50 mM, ou nas proporções de 1:1 ou 1:6 (proteína:açúcar) (Carpenter *et al.*, 1997; Gibson & Woodward, 1993; Kobayashi *et al.*, 1984; Ru *et al.*, 2001; Sode & Yasutake, 1997; Tang & Pikal, 2004). Sode e Yasutake (1997) investigaram, dentre outros compostos, a adição de sulfato de amônia a 50 mM. Sabe-se que o glicerol é empregado em formulações farmacêuticas devido a alterações da viscosidade e formação de cristais de gelo em temperaturas abaixo de zero (Chaplin & Bucke, 1990) e assim como etileno glicol, sorbitol e xilitol tem um efeito protetor através de interações diretas (específicas ou não) com enzimas e polipeptídeos, no entanto, o glicerol apresenta a desvantagem de ser um bom substrato bacteriano (Fágáin, 1997). Etileno glicol é empregado como protetor para grupos carbonílicos em sínteses orgânicas e é conhecido por suas propriedades dessecantes (Soares *et al.*, 2002).

Poli(etileno glicol) ou PEG (polímero anfipático e lipoprotetor) também é bastante aplicado em formulações proteicas liofilizadas como a 49% em combinação com KCl (Ru *et al.*, 2001), entre 155 e 323 mM (Mine *et al.*, 2001), a 1:2 na proporção de enzima:PEG (Borole & Davison, 2007) e em conjunto com sacarose (Mosharraf *et al.*, 2007) sendo também indicado como um bom *molecular imprinter*, ou seja, ele preserva as cavidades dos sítios ativos responsáveis pelo reconhecimento da molécula de substrato (Lee & Dordick, 2002). Carboximetil celulose (CMC) é um conhecido modificador de viscosidade e um bom estabilizador de emulsões em vários produtos da indústria alimentícia.

Para Carpenter *et al.* (1997) aumentando-se a concentração enzimática, aumenta-se a resistência a degradação durante o congelamento, isso com base em especulações de que os danos são causados durante o congelamento ao se formar as interfaces água-gelo, no entanto, isso requer um estudo sobre a concentração ideal para cada sistema.

2- Materiais e Métodos

A obtenção da frutossiltransferase extracelular e parcialmente purificada do meio de cultivo de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 procedeu-se conforme descrito em trabalho de Aguiar-Oliveira and Maugeri (2010) onde também encontram-se descritas as metodologias necessárias para a determinação da atividade enzimática livre por Somogyi-Nelson e kit enzimático Glucose-Oxidase, e identificação e quantificação dos açúcares provenientes das sínteses de FOS por HPLC-PAD.

2.1- Seleção dos aditivos

Os aditivos avaliados neste estudo foram: polietileno glicol (PEG 6000), carboximetil celulose (CMC), etileno glicol, manitol, glicerol, sulfato de amônia, sorbitol, inositol, xilitol, trealose além do tampão acetato de sódio (pH 4,5) em concentrações maiores que a concentração ótima para a fructosyltransferase (50 mM): 100 e 200 mM. Estes compostos foram adquiridos de marcas confiáveis e disponíveis no mercado.

Numa primeira etapa cada aditivo foi avaliado individualmente a uma concentração de 2,5% (p/v or p/p) com a frutossiltransferase parcialmente purificada. Após a análise do efeito individual dos aditivos, alguns foram escolhidos para composição de formulações: CMC, PEG 6000, manitol, xilitol, trealose e sulfato de amônia, todos a 1,25% (p/v), sendo o meio de diluição empregado para obtenção dos liofilizados o tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5.

2.2- Preparo das amostras e etapas de análises

Na primeira etapa de avaliação individual do efeito de cada aditivo, todos os liofilizados foram realizados em duplicata, cada um com 3,0 mL. Foram utilizadas para liofilização uma solução enzimática sem diluição e uma com diluição de 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5; cada aditivo foi avaliado com a solução enzimática (parcialmente purificada) não diluída e a diluída. Nesta primeira etapa os aditivos foram avaliados nas concentrações de 2,5% (p/v), apenas o CMC foi avaliado também a 1,25% (p/v).

Após a seleção dos aditivos de melhores desempenhos individuais sobre a enzima livre liofilizada foram definidas três formulações contendo dois aditivos para a enzima livre

diluída a 1:2 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 e três formulações contendo três aditivos para a enzima livre diluída em mesmo tampão porém em 1:6 (v/v) (Tabelas 1 e 4). Nesta segunda etapa, o preparo das amostras foi conduzido de forma semelhante aos primeiros testes, em duplicata e a concentração de cada aditivo na formulação foi de 1,25% (p/v).

Com base em resultados obtidos em estudos anteriores (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011), o estudo do efeito de uma pré-ativação antes da liofilização, obtida através de 15 min de incubação a 52 ou 60°C seguida de banho de gelo, foi realizado com a enzima livre. A incubação nestas duas temperaturas foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5.

Foram determinadas as densidades das soluções enzimáticas não diluída e diluída em 1:2 e 1:6 (v/v) utilizadas nos experimentos com o auxílio de uma balança analítica, as medidas foram feitas em quadruplicata e a diluição em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5.

2.3- Liofilização da frutosiltransferase

Todas as amostras após serem devidamente preparadas foram congeladas a -60°C em um ultra-freezer por cerca de 18 h antes de proceder à liofilização. Após este primeiro congelamento as amostras foram liofilizadas por 24 h em um liofilizador de bancada do tipo Terroni[®] modelo Interprise 1, onde foram congeladas a ≈ -55 °C por um compressor hermético com ventilação forçada (ar) e utilizando uma bomba a vácuo de 5/370 (CFM/W). As tortas liofilizadas foram delicadamente desfeitas (moídas) com o auxílio de uma bagueta de vidro, até formarem pó. Os liofilizados obtidos foram estocados em freezer (-20°C), em frascos de vidro comum sem fechamento a vácuo, até que todas as análises tivessem sido feitas num tempo inicial que não ultrapassou 1 semana após a liofilização (t = 0) e após 6 meses de estoque (t = 6 m) para análise da *shelf-life*.

2.4- Caracterização dos liofilizados

De acordo com Carpenter *et al.* (1997) a análise final de um formulado proteico liofilizado deve considerar fatores como: estabilidade protéica durante e após a liofilização,

aplicação do liofilizado final, tonicidade do formulado, estrutura da torta liofilizada e outras propriedades físico-químicas do liofilizado final.

Atividade enzimática dos liofilizados da frutossiltransferase foi determinada a partir de uma solução contendo 0,02 g de pó liofilizado diluídos em 10 mL totais de tampão acetato 50 mM e pH 4,5; para as sínteses de FOS foram utilizados 0,02 g do pó em 5 mL totais de meio padrão para síntese: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetado de sódio 50 mM e pH 4,5.

Todas as amostras liofilizadas obtidas foram analisadas em comparação com uma condição padrão não liofilizada e sem nenhum aditivo. Os liofilizados obtidos foram caracterizados, principalmente, quanto a: atividade enzimática residual liofilizada (Eq. 01), atividade residual térmica liofilizada (Eq. 02), atividade enzimática específica liofilizada (Eq.03), conversão da sacarose em FOS (Eq.04), produtividade específica de FOS (Eq.05) e *shelf-life* por 6 meses sob condições refrigeradas.

a) Atividade Residual Liofilizada (R_o^{Liof}): expressa pela Equação 01, sendo U_{TF}^{Liof} a atividade enzimática da amostra liofilizada e U_{TF}^o a atividade enzimática padrão não liofilizada.

$$R_o^{Liof} = \frac{U_{TF}^{Liof}}{U_{TF}^o} \quad (01)$$

b) Atividade Residual Térmica Liofilizada ($R^{Liof.65^\circ C}$): expressa pela Equação 02, sendo U_{TF}^{Liof} a atividade enzimática inicial e $U_{TF}^{Liof.65^\circ C}$ a atividade enzimática liofilizada após incubação a 65°C por 15 minutos.

$$R^{Liof.65^\circ C} = \left(\frac{U_{TF}^{Liof.65^\circ C}}{U_{TF}^{Liof}} \right) \quad (02)$$

c) Atividade Enzimática Específica Liofilizada ($*U_{pin}^{Liof}$): expressa pela Equação 03, sendo a relação entre a atividade enzimática e o valor de proteína (mg) determinado por grama de liofilizado (U/mg de proteína). O conteúdo total de proteína dos liofilizados foi determinada por metodologia de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

$$*U_{pin}^{Liof} = \frac{U_{TF}^{Liof}}{mg} \quad (03)$$

d) Conversão da Sacarose em FOS (Y_{FOS}): expressa pela Equação 04, sendo [FOS] a concentração (g/L) dos FOS totais obtidos e a concentração inicial de sacarose de 500 g/L. Amostras de 200 μ L foram coletadas das sínteses em diferentes tempos e analisadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD) conforme metodologia descrita em trabalho anterior (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010).

$$Y_{FOS} = \frac{[FOS]}{[sucrose]} = \frac{[FOS]}{500 \text{ g/L}} \quad (04)$$

e) Produtividade específica de FOS (Pr_{FOS} ; $mg/U_{TF}.mL$ ou $mg/U_{TF}^{Liof}.mL$): expressa pela Equação 05, sendo a relação entre a concentração (mg/mL) dos FOS totais pela concentração de atividade enzimática utilizada na síntese (U_{TF}/mL ou U_{TF}^{Liof}/mL) e o tempo de síntese decorrido (h).

$$Pr_{FOS} = \frac{[FOS]}{(U_{TF})(h)} \text{ ou } \frac{[FOS]}{(U_{TF}^{Liof})(h)} \quad (05)$$

f) Atividade de água (A_w): liofilizados simples padrão da enzima livre (não diluída e diluída em 1:2 e 1:6 v/v) tiveram suas atividades de água (A_w) determinadas a 25°C no tempo zero (logo após a liofilização) e após 6 meses de estoque refrigerado (-20°C). As leituras foram feitas em triplicata em um AquaLab Serie 3TE, Decagon Devices Inc. (EUA).

g) Redução do peso e da atividade enzimática após a liofilização: A redução do peso das amostras após a liofilização foi determinada a partir de amostras de 6 g (peso antes da liofilização) de soluções enzimáticas sem nenhum aditivo (não diluída e diluída em 1:2 e 1:6 v/v) e após a liofilização o novo peso foi determinado para obtenção da relação: g de liofilizado final obtido/g de solução enzimática, que determina a perda de peso durante o processo. A redução da atividade enzimática após a liofilização foi avaliada para estas mesmas soluções utilizando o fator de perda de atividade ($F_{U_{TF}}$; Equação 06), ou seja, a relação entre os valores de atividade enzimática total do liofilizado final (U_{TF}^{Liof}) e da atividade enzimática total das soluções iniciais (U_{TF}) cujo peso inicial foi de 6 g.

$$F_{U_{TF}} = \left(\frac{U_{TF}^{Liof}}{g} \right) * (g)^{liofilizado_final} / \left(\frac{U_{TF}}{g} \right) * (6g)^{solucao_inicial} = (U_{TF}^{Liof}) / (U_{TF}) \quad (06)$$

3- Resultados e Discussão

Nesta etapa do estudo, foi utilizada uma solução enzimática não diluída com atividade de $134,06 \pm 13,68 U_{TF}/mL$, cujo valor corrigido com base no valor da sua densidade de $\rho = 0,718 \pm 0,050 g/mL$ equivale a $186,65 \pm 19,04 U_{TF}/g$. A liofilização desta solução forneceu um material liofilizado com atividade de $763,64 \pm 16,71 U_{TF}^{Liof} / g$, um aumento de 4 vezes no valor da atividade enzimática por peso. A perda de peso após a liofilização foi de ~85% sendo que cada 1 g da solução enzimática resultou em $0,1522 \pm 0,026 g$ de liofilizado. Com relação à perda de atividade enzimática durante o processo, o fator $F_{U_{TF}}$ (Eq. 06) foi de 0,62, ou seja, houve uma perda de ~38% da atividade enzimática durante o processo. A atividade de água determinada para este liofilizado logo após a liofilização foi de $A_w = 0,187 \pm 0,001$.

Uma solução enzimática diluída em 1:2 (v/v) com tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 a partir da solução concentrada apresentou uma densidade de $\rho = 0,993 \pm 0,016 g/mL$. A redução de peso após a liofilização de ~89%, sendo que a partir de 1 g desta solução diluída obteve-se $0,1129 \pm 0,014 g$ de liofilizado; o fator de redução da atividade enzimática ($F_{U_{TF}}$ – Eq. 06) foi de 0,73 sendo esta a menor perda de atividade dentre as três condições analisadas (~27% de perda). A atividade de água deste liofilizado no tempo zero foi de $A_w = 0,192 \pm 0,004$. De acordo com Oetjen e Haseley (2004) o congelamento de uma solução orgânica complexa é geralmente difícil de prever e a taxa de crescimento dos cristais de gelo é crucial porque depende da temperatura inicial de congelamento e da viscosidade da solução que aumenta fortemente com o aumento da concentração da solução; a água não propriamente congelada pode formar oclusões de alta viscosidade entre os cristais; a adição de componentes pode também retardar a cristalização devido a viscosidade inicial da solução.

De forma semelhante, uma diluição em 1:6 (v/v) da mesma solução inicial apresentou uma densidade de $\rho = 0,996 \pm 0,010 g/mL$. A redução de peso após a liofilização de aproximadamente 96%, sendo que a partir de 1 g da solução diluída obteve-se $0,0258 \pm 0,009 g$ de liofilizado; o fator de redução da atividade enzimática ($F_{U_{TF}}$) foi de 0,20 apresentando a maior perda de atividade dentre as três condições analisadas, ~80% de

perda. A atividade de água deste liofilizado no tempo zero foi de $A_w = 0,276 \pm 0,001$ e sua atividade enzimática foi de $616,70 \pm 8,52 U_{TF}/g$, um valor apenas 0,84 vezes menor que o obtido com o liofilizado não diluído e 3 vezes maior (em peso) que a atividade enzimática da solução enzimática inicial (não diluída). A solução inicial não diluída e sua diluição em 1:6 foram utilizadas na etapa inicial de avaliação individual dos aditivos na liofilização da frutosiltransferase.

A análise visual das tortas liofilizadas obtidas (de cor marrom claro) ressaltou diferenças entre as condições provenientes da solução concentrada e de suas diluições. Os liofilizados da solução não diluída resultam numa torta final mais resistente à moagem, chegando a formar grânulos grandes e irregulares (Figura 1.a) e de dissolução (ou re-suspensão) mais demorada, exigindo agitação por mais tempo; os liofilizados obtidos de soluções diluídas resultam em uma torta muito mais fácil de ser moída, de granulometria fina e fácil dissolução, especialmente a diluição 1:6 (Figura 1.c).

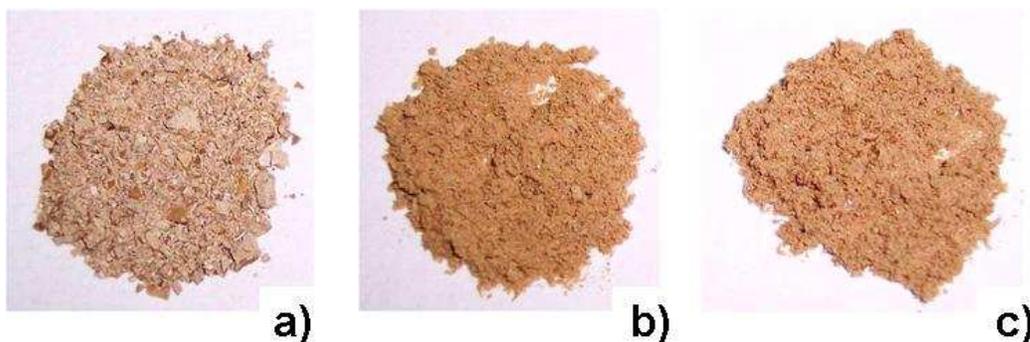


Figura 1: Liofilizados simples da frutosiltransferase parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 obtidos de soluções enzimáticas: **a)** não diluída ($A_w = 0,187 \pm 0,001$; maior resistência a quebra da torta liofilizada e a dissolução) e diluída em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 em **b)** 1:2 v/v ($A_w = 0,192 \pm 0,004$; pó uniforme; fácil dissolução) e **c)** 1:6 v/v ($A_w = 0,276 \pm 0,001$; coloração mais clara; pó muito fino e uniforme; fácil dissolução).

De acordo com diversos autores, mesmo após a liofilização um preparado enzimático ainda contém água, que está fortemente ligada, e é fator crucial para o produto final, pois, a água atua muitas vezes como um catalisador para as enzimas ao aumentar a flexibilidade interna de suas moléculas ou ativar reações deteriorativas; de forma geral, a instabilidade é aumentada quando o liofilizado final contém água acima ou abaixo de um limite ideal denominado camada de água (*Mo*) (Cabral *et al.*, 1994; Costantino *et al.*, 1998; Fágain,

1997; Mosharraf *et al.*, 2007). É importante também lembrar que durante ou imediatamente após a liofilização (*freeze drying*) e/ou reconstituição (reidratação) podem se formar agregados irreversíveis, fenômeno comumente associado a liofilizados protéicos mal formulados ou preparados (Hirakura *et al.*, 2004; Carpenter *et al.*, 1997), resultando em um preparado com baixa atividade.

3.1- Estudo dos efeitos individuais de aditivos na liofilização da frutosiltransferase

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nesta primeira etapa do estudo da liofilização com a enzima livre e o efeito dos aditivos selecionados para o estudo.

Todos os liofilizados contendo algum aditivo apresentaram aumento na atividade enzimática após a liofilização ($R_o^{Liof} > 1,0$) em comparação com a condição padrão não liofilizada (Ftase sem diluição). De acordo com a Tabela 1, a liofilização da solução enzimática não diluída resultou num aumento da atividade enzimática por peso em mais de 4 vezes, e a liofilização da solução diluída em 1:6 (v/v) resultou num aumento de mais de 3 vezes; essa pequena diferença nos valores de R_o^{Liof} entre os liofilizados simples reflete o fato de que soluções muito concentradas induzem a formação de agregados proteicos que diminuem a atividade enzimática final efetiva. A solução enzimática não diluída e contendo PEG 6000 e CMC a 2,5% (p/v), a solução enzimática diluída (1:6) em tampão acetato 200 e 100 mM e a solução diluída e adicionada de PEG 6000 e inositol a 2,5% (p/v) foram, em ordem decrescente os maiores valores de atividade enzimática residual obtidos ($3,50 < R_o^{Liof} < 5,0$). Há relatos na literatura de que a adição de sorbitol, manitol e acetato de sódio todos a 1 mol/L resultou em 75,3, 67,3 e 81,2%, respectivamente, de atividade enzimática residual após o congelamento e descongelamento da lactato desidrogenase (Oetjen & Haseley, 2004).

A atividade residual térmica liofilizada ($R^{Liof.65^\circ C}$) revela que a liofilização das soluções enzimáticas simples aumentou a estabilidade térmica em relação a solução não liofilizada; para os liofilizados simples, a diluição 1:6 (v/v) aumentou em 9% a estabilidade térmica. Com relação a liofilização da solução enzimática não diluída nenhum dos aditivos

Table 1: Caracterização da frutossiltransferase (parcialmente purificada) (Ftase) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em presença e ausência de aditivos estabilizantes. Os parâmetros de caracterização foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática térmica residual [$R^{Liof 65^\circ C}$], atividade enzimática específica liofilizada [$*U_{ptn}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS após 24 h [Y_{FOS}] e produtividade específica de FOS após 24 h [Pr_{FOS} (mg/U.h)]. Síntese realizada com 0,02 g de liofilizado em 5 mL de 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5.

Solução Enz. Inicial (Ftase parc. Purific.)	U_{TF}°/g	$R^{65^\circ C}$ ($U_{TF}^{65^\circ C}/U_{TF}^{\circ}$)	$*U_{ptn}$ ($U_{TF}^{\circ}/mg\ ptn.$)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
	186,65 ± 19,04	0,37 ± 3,8E ⁻²	5,59 ± 0,16	0,45	17,63
Liofilizados a partir da solução enzimática inicial sem diluição					
Enzima Liofilizada Sem aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
	4,11 ± 0,35	0,58 ± 1,4E ⁻²	5,16 ± 0,15	0,42	2,89
Enzima Liofilizada Com aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
CMC – 2,5% (p/v)	4,46 ± 0,40	0,38 ± 1,7E ⁻²	6,27 ± 0,08	0,50	4,64
Etileno glicol – 2,5% (v/v)	2,99 ± 0,14	0,25 ± 2,3E ⁻²	2,96 ± 0,14	0,52	4,41
Glicerol – 2,5% (p/v)	2,54 ± 0,37	0,43 ± 3,5E ⁻²	3,36 ± 0,15	0,49	4,34
Inositol – 2,5% (p/v)	3,47 ± 0,41	0,41 ± 7,9E ⁻³	4,59 ± 0,02	0,41	3,84
Manitol – 2,5% (p/v)	3,30 ± 0,25	0,35 ± 2,2E ⁻²	4,37 ± 0,06	0,50	5,54
PEG 6000 – 2,5% (p/v)	4,91 ± 0,19	0,32 ± 8,6E ⁻³	6,42 ± 0,21	0,59	3,33
Sorbitol – 2,5% (p/v)	3,04 ± 0,37	0,28 ± 7,8E ⁻²	4,01 ± 0,13	0,30	2,40
Sulfato de amônia – 2,5% (p/v)	3,15 ± 0,34	0,50 ± 5,2E ⁻²	4,55 ± 0,10	0,50	4,61
Trealose – 2,5% (p/v)	3,38 ± 0,30	0,35 ± 1,7E ⁻²	4,09 ± 0,07	0,47	3,65
Xilitol – 2,5% (p/v)	3,00 ± 0,29	0,57 ± 3,5E ⁻³	3,95 ± 0,12	0,33	2,74
Liofilizados a partir da solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5					
Enzima Liofilizada sem aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
	3,32 ± 0,28	0,63 ± 3,6E ⁻²	4,65 ± 0,02	0,44	3,75
Enzima Liofilizada com aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
CMC – 2,5% (p/v)	1,85 ± 0,15	0,76 ± 4,2E ⁻²	2,83 ± 0,01	0,44	5,32
CMC – 1,25% p/v	2,99 ± 0,28	0,57 ± 9,8E ⁻³	4,22 ± 0,08	0,45	10,89
Etileno glicol – 2,5% (v/v)	1,16 ± 0,10	0,58 ± 4,3E ⁻²	1,56 ± 0,03	0,17	2,45
Glicerol – 2,5% (p/v)	2,09 ± 0,25	0,28 ± 1,8E ⁻²	3,94 ± 0,03	0,37	4,89
Inositol – 2,5% (p/v)	2,44 ± 0,31	0,31 ± 6,2E ⁻³	5,35 ± 0,08	0,33	4,79
Manitol – 2,5% (p/v)	1,95 ± 0,19	0,27 ± 2,3E ⁻²	3,95 ± 0,03	0,38	5,06
PEG 6000 – 2,5% (p/v)	3,57 ± 0,28	0,71 ± 1,4E ⁻²	4,80 ± 0,08	0,44	3,43
Sorbitol – 2,5% (p/v)	2,44 ± 0,31	0,26 ± 8,7E ⁻³	4,99 ± 0,03	0,31	3,58
Sulfato de Amônia – 2,5% (p/v)	2,14 ± 0,23	0,26 ± 3,4E ⁻³	3,62 ± 0,11	0,37	4,04
Trealose – 2,5% (p/v)	1,90 ± 0,25	0,63 ± 7,2E ⁻²	3,77 ± 0,08	0,47	3,68
Xilitol – 2,5% (p/v)	1,93 ± 0,13	0,61 ± 8,1E ⁻²	3,89 ± 0,05	0,34	5,01
Liofilizados a partir da solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetado de sódio pH 4,5					
Concentração do tampão	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
100 mM	3,62 ± 0,42	0,52 ± 4,4E ⁻²	4,97 ± 0,08	0,39	3,00
200 mM	3,65 ± 0,45	0,55 ± 7,1E ⁻³	5,04 ± 0,06	0,41	3,12

analisados resultou num aumento da estabilidade térmica em relação a condição simples não diluída ($R^{\text{Liof.65}^\circ\text{C}} = 0,58$) apenas a adição de xilitol resultou num valor próximo ($R^{\text{Liof.65}^\circ\text{C}} = 0,57$). A liofilização da solução enzimática diluída (1:6) teve sua estabilidade térmica aumentada com a adição de PEG 6000 ($R^{\text{Liof.65}^\circ\text{C}} = 0,71$) e CMC ($R^{\text{Liof.65}^\circ\text{C}} = 0,76$) ambos a 2,5% (p/v); a adição de trealose não interferiu na estabilidade térmica.

Por se tratar de uma solução enzimática parcialmente purificada, a atividade enzimática específica liofilizada ($*U_{ptn}^{\text{Liof}}$) deve ser analisada com cautela, pois juntamente com a enzima são precipitadas outras proteínas não identificadas, portanto, $*U_{ptn}^{\text{Liof}}$ é basicamente um reflexo da atividade enzimática apresentada pelo liofilizado conforme apresentado na Equação 03. Após a liofilização, o liofilizado simples obtido da solução não diluída apresentou uma atividade específica semelhante a da solução não liofilizada; a diluição e liofilização resultaram numa atividade específica 10% menor que o padrão não diluído. O maior valor foi obtido com o liofilizado da solução não diluída adicionada de PEG 6000.

As sínteses de FOS conduzidas com os liofilizados sem aditivos e a solução não liofilizada apresentaram conversões semelhantes entre si ($0,42 < Y_{\text{FOS}} < 0,45$) e dentre as condições liofilizadas com aditivos a grande maioria dos valores de Y_{FOS} obtidos após 24 h foi próxima ou superior aos valores obtidos com os liofilizados simples. As maiores conversões ($Y_{\text{FOS}} > 0,45$) foram obtidas com o liofilizado da solução não diluída acrescentado de: PEG 6000, CMC, etileno glicol, manitol, glicerol, sulfato de amônia e trealose, todos a 2,5 % (p/v); com o liofilizado da solução diluída apenas a adição de trealose aumentou Y_{FOS} . Conforme dados apresentados por Hernalsteens e Maugeri (2008) com a frutossiltransferase sob as mesmas condições de síntese e com $3 U_{\text{TF}}/\text{mL}$, foi possível obter com 24 h de reação, um Y_{FOS} de 0,45; nas condições de síntese analisadas as concentrações enzimáticas utilizadas variaram entre 1,5 até $3,7 U_{\text{TF}}^{\text{Liof}}/\text{mL}$.

A produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) com 24 h de síntese é basicamente um reflexo da conversão obtida nas sínteses. De forma geral, os liofilizados obtidos da solução diluída apresentaram maiores produtividades específicas que os liofilizados provenientes da solução não diluída. Para os liofilizados da solução não diluída todos os aditivos resultaram

em maiores valores de Pr_{FOS} do que a solução não diluída e simples ($Pr_{FOS} = 2,89 \text{ mg}/U_{TF}^{Liof} \cdot h$, equivalente a $8,81 \text{ g/L}\cdot h$), exceto pelo xilitol ($Pr_{FOS} = 2,74$) e sorbitol ($Pr_{FOS} = 2,40$); para os liofilizados da solução diluída em tampão acetato a 100 e 200 mM e diluída contendo PEG 6000, etileno glicol, sorbitol e trealose Pr_{FOS} foi menor em comparação com a solução diluída 1:6 (v/v) simples ($Pr_{FOS} = 3,75 \text{ mg}/U_{TF}\cdot h$, equivalente a $9,26 \text{ g/L}\cdot h$).

3.2- Avaliação dos liofilizados simples após 6 meses de estoque a -20°C:

Após 6 meses de estoque a -20°C , foi possível observar um aumento na atividade de água dos padrões liofilizados simples obtidos de soluções enzimáticas não diluída e diluída em 1:2 e 1:6 (v/v) – Figura 1. Para o liofilizado simples obtido de uma solução não diluída a atividade de água determinada após 6 meses foi de $A_w = 0,223 \pm 0,001$ (aumento de $\sim 19\%$); o liofilizado obtido de soluções enzimática diluídas em 1:2 e 1:6 (v/v) apresentaram atividade de água de, respectivamente: $A_w = 0,392 \pm 0,004$ (aumento de ~ 2 vezes) e $A_w = 0,288 \pm 0,005$ (aumento de menos de 5%).

Dentre os resultados apresentados na Tabela 1 as condições liofilizadas que apresentaram no mínimo 70% do valor da atividade enzimática dos liofilizados padrão sem aditivos (com e sem diluição) foram selecionadas para avaliação da *shelf-life* após 6 meses de estocagem. Após a estocagem, estas condições apresentadas na Tabela 2 foram avaliadas quanto a atividade residual de estocagem, ou seja, a manutenção da atividade enzimática em relação a sua própria atividade enzimática inicial ($R_{6m}^{Liof} = U_{TF}^{Liof(t=6m)} / U_{TF}^{Liof(t=0)}$), com base na Equação 1. As atividades enzimáticas obtidas com os liofilizados padrão sem aditivos, diluído e não diluído, após 6 meses apresentaram o mesmo valor (Tabela 2), o que representa uma retenção de 66 e 82% , respectivamente, da atividade enzimática. Dentre as outras condições avaliadas, os dois maiores valores de atividade enzimática liofilizada observados foram com as condições: sulfato de amônia ($802,11 U_{TF}^{Liof}/g$) e xilitol ($700,98 U_{TF}^{Liof}/g$), ambos provenientes da solução enzimática não diluída, representando um aumento de aproximadamente 37 e 26% , respectivamente, da atividade enzimática após 6 meses. Isto poderia ser explicado pela possível absorção de água ao longo do tempo de estocagem associado ao tipo de aditivo que de alguma forma podem ter devolvido certa flexibilidade às moléculas aumentando assim sua atividade.

A Tabela 2 mostra que os melhores resultados de manutenção da atividade enzimática após 6 meses de estoque, expressos pela atividade enzimática residual de estoque ($R_{6m}^{Liof} > 0,9$), foram obtidos com os aditivos: sulfato de amônia, xilitol, manitol e inositol (a 2,5% p/v) e CMC (a 1,25% p/v). As condições simples apresentaram perda de atividade enzimática após os 6 meses de estoque: o liofilizado da solução enzimática diluída apresentou uma redução de 18% da atividade enzimática inicial e o liofilizado padrão não diluído 34% de redução.

Table 2: Análise da atividade residual liofilizada (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estocagem, em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Table 1) com a frutossiltransferase parcialmente purificada e liofilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. A atividade enzimática liofilizada dos padrões sem aditivos após 6 meses foi de $507,72 U_{TF}^{Liof} / g$ para as duas condições: com e sem diluição.

Liofilizados a partir da solução enzimática inicial sem diluição	
Enzima Liofilizada	$R_{6m}^{Liof}{}^a$
Liofilizado sem aditivo	0,66
CMC (2,5% p/v)	0,58
Manitol (2,5% p/v)	1,03
PEG 6000 (2,5% p/v)	0,45
Sorbitol (2,5% p/v)	1,10
Sulfato de Amônia (2,5% p/v)	1,37
Trealose (2,5% p/v)	0,80
Xilitol (2,5% p/v)	1,26
Liofilizado a partir da solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5	
Enzima Liofilizada	$R_{6m}^{Liof}{}^a$
Liofilizado sem aditivo	0,82
CMC (2,5% p/v)	0,80
CMC (1,25% p/v)	1,07
Inositol (2,5% p/v)	0,92
PEG 6000 (2,5% p/v)	0,67
Sorbitol (2,5% p/v)	0,79
Liofilizado a partir da solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio em pH 4,5	
Concentração do tampão	$R_{6m}^{Liof}{}^a$
100 mM	0,68
200 mM	0,84

$${}^a R_{6m}^{Liof} = U_{TF}^{Liof(t=6m)} / U_{TF}^{Liof(t=0)}$$

Sínteses de FOS foram realizadas apenas com os dois liofilizados padrão sem aditivos (sem diluição e diluído em 1:6 v/v) estocados por 6 meses com o objetivo de se avaliar isoladamente o efeito da liofilização e da estocagem sobre a capacidade biocatalítica da enzima. Os resultados obtidos se encontram expressos na Figura 2.

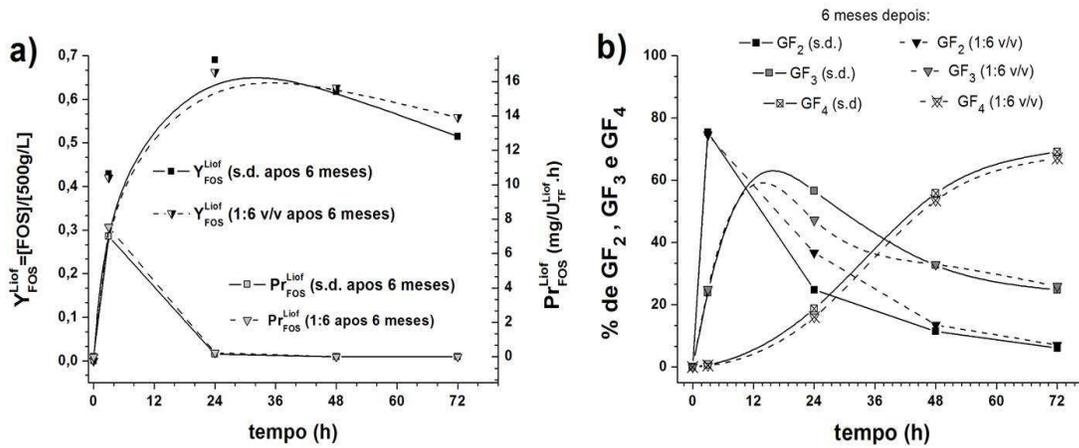


Figure 2: a) Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e b) composições percentuais dos FOS provenientes de sínteses conduzidas com o liofilizado padrão sem aditivos da frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10: sem diluição (s.d.) (quadrados e linhas cheias) e diluído (triângulos invertidos e linhas tracejadas) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 em 1:6 (v/v); os liofilizados foram estocados a -20°C por 6 meses e sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5, 50°C , $10 \text{ U}_{TF}^{Liof}/\text{mL}$.

A Figura 2.a apresenta os valores de conversão (Y_{FOS}) e produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) para estas duas condições analisadas. Os resultados obtidos foram muito semelhantes entre si, tendo sido usadas em ambas as sínteses $10 \text{ U}_{TF}^{Liof}/\text{mL}$: as duas sínteses apresentaram valores de Y_{FOS} decrescentes a partir de 24 h (Y_{FOS} em 24 h com o liofilizado sem diluição (s.d.) foi de 0,69 e com a diluição de 1:6 (v/v) foi de 0,66), a produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) teve seu máximo valor em 3 horas para ambas as condições (em torno de $7 \text{ mg}/\text{U}_{TF}^{Liof}.h$). A Figura 2.a mostra que após 6 meses de estoque refrigerado os liofilizados sem aditivos mantiveram sua capacidade de transfrutossilacção. Em ambos os casos, 1-kestose (GF₂) foi muito hidrolisada chegando após 72 h de síntese a composições de 6-7% dos FOS totais e 1^F-frutofuranosil nistose (GF₄) apresentou altas composições, chegando a valores de quase 70% (em média, 182,49 g/L) após 72 h de sínteses para ambos

os liofilizados (Figure 2.b). Este resultado nunca foi observado anteriormente com esta enzima, e é muito interessante, pois sabe-se que quanto maior a molécula de FOS, maiores são seus benefícios ao organismo (Stewart *et al.*, 2008) no entanto, outros estudos sugerem que o menor grau de polimerização ($n = 2$) é mais eficiente no aumento dos pró-bióticos (Suzuki *et al.*, 2006). A liofilização da enzima de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 alterou sua especificidade de tal forma a aumentar significativamente a composição de FOS, com aumento relativo de GF₄, sendo que sob condições otimizadas com o biocatalisador FTase/Nióbio, não liofilizado, a fração relativa de GF₄ foi de 4% (11,90 g/L) (Aguar-Oliveira *et al.*, 2011).

3.3- Estudo de formulações para liofilização da frutossiltransferase

Com base nos resultados apresentados pelos efeitos dos aditivos sobre a liofilização da frutossiltransferase, algumas formulações e novas condições de liofilização foram determinadas levando-se em consideração, especialmente, os melhores resultados demonstrados pelos aditivos quanto à atividade residual liofilizada, atividade residual térmica liofilizada, conversão da sacarose em FOS e *shelf-life*, conforme apresentado na Tabela 3.

Como o liofilizado obtido de uma solução enzimática sem diluição apresentou dificuldade de quebra da torta liofilizada e necessita de um tempo maior para dissolução (ou re-suspensão), optou-se pela nova condição de diluição, 1:2 (v/v) em tampão acetato. Como os liofilizados diluídos a 1:6 com tampão acetato 200 mM apresentaram alguns dos maiores valores para a atividade residual liofilizada térmica (Tabela 1), escolheu-se esta condição de tampão para composição de formulações com os liofilizados, uma vez que, há relatos do uso bem sucedido de tampões em concentrações mais elevadas (Morgan & Clark, 2004; Roy & Gupta, 2004; Ru *et al.*, 2001).

Os compostos CMC e PEG 6000 também apresentaram boa atividade residual liofilizada e residual térmica (Table 1), sendo assim selecionados como *bulking agentes*. O composto sulfato de amônia foi selecionado para ser analisado em formulações com a menor diluição enzimática (1:2) devido à atividade residual térmica liofilizada e a conversão de FOS obtidas com o liofilizado proveniente da solução enzimática não diluída

Tabela 3: Caracterização de liofilizados formulados da frutossiltransferase parcialmente purificada (FTase), onde os parâmetros de caracterização, para 1 g de solução e de liofilizado, foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática residual térmica liofilizada [$R^{Liof,65^\circ C}$], atividade enzimática específica liofilizada [U_{ptn}^{Liof}], conversão da sacarose em FOS após 72 h [Y_{FOS}] e produtividade específica de FOS após 72 h de síntese [Pr_{FOS} : mg/U.h]. As análises foram feitas em duplicatas. Sínteses realizadas com 0,02 g de liofilizado em 5 mL de 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5.

Soluções enzimáticas obtidas por diluição em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 (FTase parcialmente purificada)					
Padrões não liofilizados	$U_{TF}^{\circ/g}$	$R^{65^\circ C}$ ($U_{TF}^{65^\circ C}/U_{TF}^{\circ}$)	U_{ptn}^{Liof} ($U_{ptn}^{\circ}/mg_{-ptn}$)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
Diluição de 1:2 (v/v)	179,47 ± 5,98	0,21 ± 0,01	4,77 ± 0,16	0,41 ± 0,01	3,94 ± 0,14
Diluição de 1:6 (v/v)	135,02 ± 4,34	0,18 ± 0,01	5,02 ± 0,05	0,59 ± 0,04	15,95 ± 1,03
Liofilizados a partir de uma solução enzimática inicial diluída em 1:2 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5					
Liofilizado sem aditivos (padrão 1:2)	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof,65^\circ C}$ (Eq. 02)	U_{ptn}^{Liof} (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
	6,46 ± 0,15	0,36 ± 4,1E ⁻³	7,54 ± 0,07	0,62 ± 0,02	0,93 ± 0,03
Composição (% p/v) dos formulados (1:2)	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof,65^\circ C}$ (Eq. 02)	U_{ptn}^{Liof} (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
PEG 6000 (1,25%) + sulfato de amônia (1,25%) + manitol (1,25%)	4,26 ± 0,18	0,33 ± 0,01	4,98 ± 0,37	0,63 ± 0,01	1,43 ± 0,03
PEG 6000 (1,25%) + sulfato de amônia (1,25%) + xilitol (1,25%)	3,19 ± 0,21	0,54 ± 0,10	3,73 ± 0,37	0,55 ± 0,01	1,66 ± 0,04
PEG 6000 (1,25%) + sulfato de amônia (1,25%) + trealose (1,25%)	3,14 ± 0,36	0,41 ± 0,01	3,65 ± 0,29	0,60 ± 0,06	1,85 ± 0,18
Liofilizados a partir de uma solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5					
Liofilizado sem aditivo (padrão 1:6)	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof,65^\circ C}$ (Eq. 02)	U_{ptn}^{Liof} (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
	3,72 ± 0,07	0,61 ± 0,03	3,64 ± 0,04	0,56 ± 0,01	1,94 ± 0,04
Composição (% p/v) dos formulados (1:6)	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof,65^\circ C}$ (Eq. 02)	U_{ptn}^{Liof} (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
CMC (1,25%) + manitol (1,25%)	2,32 ± 0,26	0,67 ± 0,14	2,27 ± 0,29	0,56 ± 0,01	3,14 ± 0,02
CMC (1,25%) + xilitol (1,25%)	1,80 ± 0,29	0,92 ± 0,05	1,75 ± 0,20	0,57 ± 4,0.E ⁻³	3,61 ± 0,28
CMC (1,25%) + trealose (1,25%)	4,76 ± 0,28	0,55 ± 0,04	4,66 ± 0,11	0,57 ± 0,01	4,09 ± 2,0E ⁻³

(Tabela 1). Manitol, xilitol e trealose foram selecionados devido ao efeito observado sobre a estabilidade térmica e por serem bons agentes crio-protetores e eficientes no controle da pressão osmótica.

As condições padrão neste estudo foram duas soluções enzimáticas diluídas em tampão acetato 50 mM e pH 4,5 em 1:2 e 1:6 (v/v) não liofilizadas; os liofilizados obtidos de soluções enzimáticas diluídas nas mesmas proporções e mesmo tampão, porém mais concentrado (200 mM), corresponde aos liofilizados sem aditivos (Tabela 3). A solução enzimática diluída em 1:2 (v/v) e não liofilizada apresentou uma atividade enzimática de 179,47 U_{TF}/g e a diluição 1:6 (v/v) apresentou atividade enzimática de 135,02 U_{TF}/g (valores corrigidos de volume para peso de acordo com as densidades de cada solução).

Os resultados obtidos com os formulados liofilizados da frutossiltransferase estão apresentados na Tabela 4, sendo todas as condições comparadas com sua condição padrão não liofilizado (n.1). A diluição 1:2 (v/v) em tampão mais concentrado possibilitou uma atividade residual liofilizada (R_o^{Liof}) cerca de 6 vezes maior em comparação com a solução líquida não liofilizada. Este resultado vem a confirmar mais uma vez a hipótese de que soluções protéicas muito concentradas tendem a promover a formação de aglomerados reversíveis ou não, fornecendo ao final uma atividade enzimática aparente menor. A diluição 1:2 (v/v) apresentou, de forma geral, resultados mais favoráveis à enzima liofilizada do que em diluição 1:6 (v/v). Nenhuma das condições formuladas e liofilizadas diminuiu a atividade enzimática em relação aos seus padrões não liofilizados ($R_o^{Liof} < 1.0$), mas com relação às condições liofilizadas sem aditivos as formulações apresentaram menor atividade residual (Tabela 3).

Analisando a atividade enzimática térmica residual liofilizada ($R^{Liof, 65^\circ C}$) observa-se que a diluição de 1:6 (v/v) apresentou maior efeito estabilizador do que a diluição 1:2 (Tabela 3) e do que o liofilizado sem diluição (Tabela 1); isso reforça a necessidade de se conhecer a melhor diluição da solução de partida, pois assim evita-se a formação de agregados que reduz a atividade enzimática. A formulação [CMC + xilitol] da diluição 1:6 (v/v) apresentou a maior estabilidade térmica dentre todas as condições analisadas

($R^{Liof.65^{\circ}C} = 0,92$), confirmando que estes dois aditivos são, conforme revisão bibliográfica, bons estabilizadores de soluções.

A atividade enzimática específica liofilizada (${}^*U_{ptn}^{Liof}$) foi aumentada em todas as formulações analisadas em comparação com seus padrões não liofilizados. A liofilização das formulações com diluição enzimática de 1:6 (v/v) apresentou os maiores valores de ${}^*U_{ptn}^{Liof}$.

As sínteses de FOS com os formulados liofilizados revelaram um aumento da conversão da sacarose (Y_{FOS}) em 72 h de reação, passando de 0,41 para 0,62 com a liofilização da solução enzimática diluída 1:2 (v/v) e uma redução na conversão de 0,59 para 0,56 após a liofilização da solução enzimática diluída 1:6 (v/v). Com a diluição 1:2 a formulação [PEG + sulfato de amônia + manitol] apresentou a maior conversão ($Y_{FOS} = 0,63$) dentre todas as condições analisadas, com uma concentração total de FOS ao final das 72 h de síntese de $314,16 \pm 6,89$ g/L. Com a diluição 1:6 os formulados liofilizados apresentaram conversões semelhantes entre si ($\sim 0,57$).

Apesar do aumento em Y_{FOS} , a produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) foi reduzida após a liofilização em aproximadamente 4 vezes com a liofilização da solução enzimática diluída em 1:2 (v/v) e em 8 vezes com a diluição de 1:6 (v/v). Os formulados preparados com a diluição 1:2 (v/v) apresentaram valores de Pr_{FOS} até duas vezes maior do que o liofilizado simples de mesma diluição; com os formulados com diluição da solução enzimática em 1:6 (v/v) observou-se o mesmo aumento de Pr_{FOS} . Em comparação com a produtividade específica de FOS obtida com os aditivos individualmente (Tabela 1) as formulações resultaram em produtividades menores (Tabela 3). Estes resultados levam a crer que a liofilização sem nenhum aditivo e em maiores diluições tornem a enzima menos protegida e talvez ela sofra alguma alteração em sua conformação que leve a redução da produtividade específica, da mesma forma como a adição excessiva de componentes na formulação podem afetar a enzima conforme relatado por diversos autores. Para uma maior compreensão dos efeitos da liofilização e formulações seria necessário realizar estudos específicos sobre a conformação da enzima e os impactos sofridos com a liofilização como citados por Oetjen e Haseley (2004), de acordo com Kaplan e Taralp (1997) alguns estudos

físico-químicos revelam que a estrutura após a liofilização pode ser muito semelhante a apresentada em solução, ou pode apresentar algumas limitações conformacionais reversíveis, mas baseado em diversos estudos, os autores declaram que com enzimas liofilizadas em solventes orgânicos a maioria mantém sua estrutura nativa.

3.4- Avaliação dos formulados liofilizados após 6 meses de estoque a -20°C

Após 6 meses de estoque a -20°C, os formulados liofilizados da frutossiltransferase foram igualmente analisados conforme conduzido na análise do efeito individual de cada aditivo. Todos os liofilizados formulados apresentados na Tabela 3 foram avaliados quanto à manutenção de suas atividades enzimáticas liofilizadas através da análise da atividade enzimática residual de estoque R_{6m}^{Liof} . Conforme demonstrado na Tabela 4, após 6 meses, os

Tabela 4: Análise da atividade residual liofilizada (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estocagem em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 4) com a frutossiltransferase (parcialmente purificada) e liofilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 em formulações. A atividade enzimática liofilizada dos padrões após 6 meses foi de $757,14 \pm 31,18 U_{TF}^{Liof} / g$ (diluição 1:2) e $431,03 \pm 44,36 U_{TF}^{Liof} / g$ (diluição 1:6). A concentração de cada aditivo foi de 1,25% (p/v) para cada formulação.

Liofilizados a partir de uma solução enzimática inicial diluída em 1:2 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5	
Formulados liofilizadas	$R_{6m}^{Liof}{}^a$
Liofilizados sem aditivos	0,65 ± 0,03
PEG + sulfato de amônia + manitol	0,52 ± 0,02
PEG + sulfato de amônia + xilitol	0,64 ± 0,14
PEG + sulfato de amônia + trealose	0,77 ± 0,04
Liofilizados a partir de uma solução enzimática inicial diluída em 1:6 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5	
Formulados liofilizados	$R_{6m}^{Liof}{}^a$
Liofilizados sem aditivos	0,86 ± 0,08
CMC + manitol	0,67 ± 0,16
CMC + xilitol	0,90 ± 0,33
CMC + trealose	0,23 ± 0,02

$${}^a R_{6meses}^{Liof} = U_{TF}^{Liof(6meses)} / U_{TF}^{Liof(t=0)}$$

liofilizados padrão sem aditivos com diluição da enzima de 1:2 e 1:6 (v/v) em tampão acetato 200 mM apresentaram uma redução de 35 e 14%, respectivamente, no valor inicial

de suas atividades enzimáticas; considerando a diluição 1:6 (v/v) em tampão acetato a 50 mM (Tabela 2) e a 200 mM (Tabela 2 e 5) é possível observar que, após 6 meses, a atividade enzimática residual de estocagem foi aumentada em torno de 5%. Dentre as formulações com a enzima diluída em 1:2 (v/v), apenas a formulação contendo [PEG + sulfato de amônia + trealose] apresentou uma perda menor ($R_{6m}^{Liof} = 0,77$) em comparação com o liofilizado sem aditivos 1:2 (v/v); dentre as formulações com a enzima diluída em 1:6 (v/v), a formulação contendo [CMC + xilitol] foi a de maior manutenção da atividade enzimática ($R_{6m}^{Liof} = 0,90$).

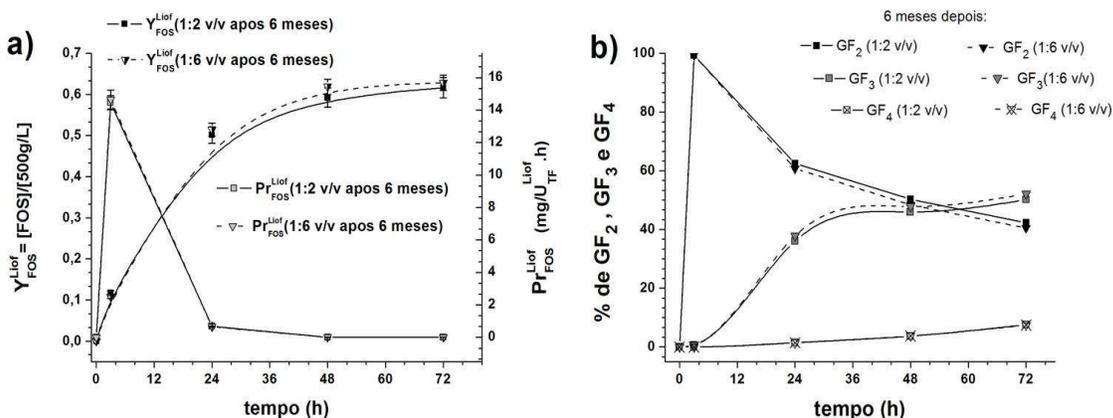


Figura 3: a) Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e b) composições percentuais dos FOS obtidos em sínteses realizadas com os liofilizados sem aditivos da frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10: diluída em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 em 1:2 v/v (quadrados e linhas cheias) e 1:6 v/v (triângulos invertidos e linhas tracejadas); os liofilizados foram estocados a -20°C por 6 meses e sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5, 50°C e $10 U_{TF}^{Liof} / \text{mL}$.

Os liofilizados sem aditivos apresentados na Tabela 4, obtidos da diluição de uma solução enzimática em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 de 1:2 e 1:6 (v/v), foram empregados em sínteses de FOS com o intuito de se avaliar adicionalmente sua capacidade biocatalítica após 6 meses de estoque, empregando-se a atividade de $10 U_{TF}^{Liof} / \text{mL}$. Os resultados obtidos de Y_{FOS} e produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) encontram-se na Figura 3.a. Mais uma vez, as duas condições de liofilizados estocados por 6 meses apresentaram Y_{FOS} e Pr_{FOS} semelhantes ao longo do tempo; os valores de Y_{FOS} foram

crescentes ao longo do tempo de síntese chegando a 0,62 (diluição 1:2) e 0,63 (diluição 1:6) ao final de 72 h; os valores de Pr_{FOS} foram máximos em 3 h de sínteses ($\sim 14 \text{ mg}/U_{TF}^{Liof} \cdot h$). Em comparação com a Figura 2.a, a produtividade específica apresentada pelos liofilizados diluídos e liofilizados em tampão de maior concentração (Figura 3.a), foi o dobro logo nas primeiras horas de síntese e a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) não apresentou um valor máximo como observado na Figura 2.a. As sínteses realizadas com os liofilizados simples 1:2 e 1:6 (v/v) apresentaram composições bem menores de GF_4 (menos de 8% ao final de 72 h para ambas) sendo o FOS predominante a nistose (GF_3) com pouco mais de 50% da composição (Figure 3.b).

3.5- Avaliação sobre o efeito da pré-ativação em 52 e 60°C antes da liofilização

Foi observado em estudo prévio (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011) que ao se incubar frutossiltransferase livre e imobilizada em nióbio ambos em pH 4,5 por 15 min a 52°C e com a enzima imobilizada em pH 6,0 também por 15 min em 60°C, seguido de 5 min em banho de gelo, obtém-se uma ativação da atividade enzimática. Dessa forma, a pré-incubação da enzima livre diluída antes da liofilização, foi realizada com o objetivo de se determinar o efeito desse tratamento e se a ativação é mantida após a liofilização. Uma solução (diluída em 1:2 v/v em tampão acetato 50 mM e pH 4,5) com atividade enzimática inicial corrigida para peso de $107,06 \pm 4,00 U_{TF}/g$ foi utilizada para liofilização sem pré-incubação (condição padrão) e com pré-incubação a 52 e 60°C.

Os resultados obtidos mostraram que a pré-incubação a 52°C reduziu a atividade enzimática liofilizada (R_o^{Liof}) a um valor $0,56 \pm 0,09$ e a 60°C este valor foi de $1,43 \pm 0,18$, este resultado é peculiar já que a temperatura de 60°C não apresentou ativação com a frutossiltransferase na forma livre, apenas imobilizada (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011). No entanto, com relação a estabilidade térmica liofilizada ($R^{Liof,65^\circ C}$) e a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) os resultados obtidos afirmaram que a pré-ativação da solução enzimática não demonstrou ser uma metodologia vantajosa: a estabilidade térmica foi de 0,17 (52°C) e 0,06 (60°C) e os valores de Y_{FOS} de 0,39 e 0,02, respectivamente. A ativação proveniente

da pré-incubação, observada em trabalho anterior (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011), sugere uma alteração conformacional e/ou energética momentânea e não acumulativa.

3.6- Efeito da liofilização sobre a síntese otimizada de FOS

Considerando estudos prévios realizados com a frutossiltransferase imobilizada para otimização das condições de síntese (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011) definiu-se as condições de 48°C, 20 U_{TF}/mL, 24 h e 50% de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0 como sendo as condições otimizadas para produção de FOS. O desempenho da frutossiltransferase livre foi também avaliado sob estas mesmas condições exceto pela concentração enzimática por volume cujo valor de 20 U_{TF}/mL foi substituído por 10 U_{TF}/mL devido a intensa coloração âmbar do meio reativo. Assim sendo, a frutossiltransferase (parcialmente purificada) foi empregada em sínteses de FOS sob as condições otimizadas citadas acima nas formas não liofilizada e liofilizada com uma diluição de 1:2 (v/v) em tampão acetato 200 mM e pH 4,5. A Figura 4 apresenta os resultados obtidos.

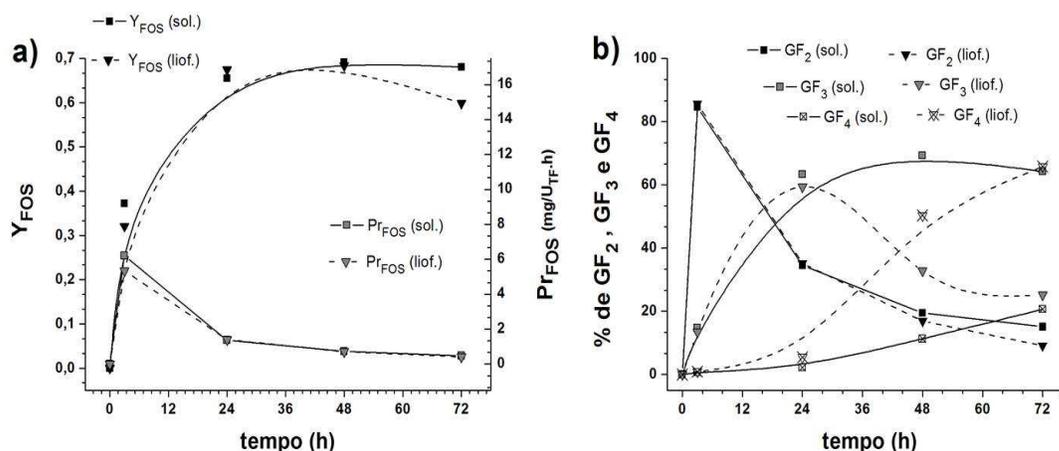


Figure 4: a) Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e b) composição percentual dos FOS obtidos com a frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 como solução não liofilizada (quadrados e linhas cheias) e liofilizada com diluição de 1:2 (v/v) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 (triângulos invertidos e linhas tracejadas). As sínteses foram realizadas sob condições otimizadas determinadas previamente: 48°C, 10 U_{TF}/mL, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0.

De acordo com a Figura 4.a, sob condições otimizadas de sínteses, é possível observar que entre 24 e 48 h Y_{FOS} atinge 0,68-0,69 e decresce com o tempo com a enzima

lioofilizada, já com a enzima em solução (não liofilizada) estes mesmos valores de Y_{FOS} foram obtidos entre 48 e 72 h; a liofilização, portanto, resulta numa estabilização da conversão num tempo menor que a enzima não liofilizada. As produtividades específicas de FOS (Pr_{FOS}) após a liofilização com 3 e 72 h de reação diminuiram para 6,03 e 29,94 $mg/U_{TF}^{Liof}.h$, respectivamente, o que equivale a valores 14 e 12 % menores do que os apresentados com a enzima não liofilizada indicando que a liofilização afetou a capacidade biocatalítica uma vez que uma unidade de atividade enzimática não liofilizada é capaz de produzir uma maior quantidade de FOS; exceto que com 48 h as produtividades são praticamente iguais (~ 54 $mg/U.h$).

Com relação a composição percentual dos FOS obtidos (Figura 4.b) observa-se que para GF_2 as composições são praticamente iguais apresentando ao final das 72 h de síntese uma composição de 9 a 15% dos FOS totais, a grande diferenciação está entre as composições de GF_3 e GF_4 . Com a enzima não liofilizada, GF_3 atinge uma composição máxima em 48 h (69%) e reduz 7% em seu valor até completar 72 h; já com a enzima liofilizada, GF_3 tem uma composição máxima de 59% com 24 h de reação e ao completar 72 h, seu valor é reduzido em quase 58% de seu valor. Para GF_4 , suas composições ao longo do tempo obtidas com a enzima não liofilizada são crescentes e com uma composição final de 21% (72 h); a liofilização mais uma vez modificou o perfil de composição de GF_4 distinguindo-o por ser um perfil crescente mais abrupto e com uma composição final pouco maior que 3 vezes em comparação com a enzima em solução.

Estudos conduzidos com uma frutossiltransferase de *Bacillus macerans* EG-6 que é capaz de produzir exclusivamente GF_4 , partindo-se de 500 g/L de sacarose, obtiveram um máximo em 48 h de síntese com 45,2% de GF_4 (Kim *et al.*, 1998); Borole e Davison (2008) observaram um aumento de 6 a 7 vezes na taxa inicial de conversão com uma lipase liofilizada com sal em meio orgânico e Wang e Wei (2007) obtiveram também com uma lipase liofilizada em presença de alguns aditivos um aumento na conversão de 1.2 a 1.7 vezes maior do que a condição padrão.

4- Conclusões

A liofilização da frutossiltransferase (parcialmente purificada) de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 demonstrou ser uma metodologia adequada para obtenção de um pó estável e de boa capacidade de transfrutossilção, aumentando ambos a atividade enzimática por peso e a estabilidade térmica. A densidade da solução demonstrou ser um fator importante, pois, como a proposta de aplicação biotecnológica desta enzima é na forma parcialmente purificada, uma vez que as diferenças biocatalíticas não justificam o custo adicional para sua purificação, faz-se necessário a diluição da solução enzimática de forma a evitar uma consistência excessivamente pastosa, resultando numa torta liofilizada de difícil moagem. Quanto mais líquido e uniforme foi o aspecto da solução enzimática de partida, melhores foram as características da torta liofilizada facilitando assim a obtenção de um pó homogêneo e de fácil re-solubilização (ou reconstituição).

Muitos autores defendem que as formulações para liofilização devem se manter o mais simples possível, e observou-se que a adição isolada de alguns compostos permite a manutenção da atividade enzimática de um liofilizado por até 6 meses. A alteração da concentração do tampão normalmente empregado com a frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 para um valor 4 vezes mais elevado também demonstrou ser favorável; esta prática de liofilização em tampões mais concentrados é comumente aplicada.

A aplicação da frutossiltransferase como um pó liofilizado não afetou sua capacidade de transfrutossilção a partir da sacarose e produção de frutooligossacarídeos. A liofilização vem contribuir de forma positiva para a aplicação industrial desta enzima ao facilitar o transporte e estoque desta enzima de forma segura e sem afetar sua funcionalidade. Mesmo tendo sido observada uma redução da atividade enzimática total após a liofilização, o liofilizado final apresenta vantagens como maior atividade enzimática por peso e menor volume ocupado. Adicionalmente, foi possível observar uma mudança significativa após a liofilização: o aumento da composição de 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) (entre 67 e 69% dos FOS totais), sendo que a enzima não liofilizada apresenta composições normalmente de 10 a 20% dos FOS totais. Estudos específicos sobre a conformação estrutural da FTase após a liofilização e consequentemente estudos cinéticos com a FTase liofilizada

forneceriam informações complementares importantes sobre os efeitos da liofilização sobre a enzima.

5- Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

6- Nomenclatura

A_w	Atividade de água	$R^{Liof, 65^\circ C}$	Atividade residual térmica liofilizada
CMC	Carboximetil celulose	U_{TF}^{Liof}	Atividade enzimática livre liofilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
$F_{U_{TF}}$	Fator de perda de atividade	U_{TF}^o, U_{TF}	Atividade enzimática livre inicial ou não liofilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
FOS	Fruto-oligossacarídeos	$U_{TF}^{Liof, 65^\circ C}$	Atividade enzimática livre liofilizada após 15 min a 65°C
[FOS]	Concentração de FOS (g/L)	$^*U_{pin}^{Liof}$	Atividade enzimática específica liofilizada (U/mg)
FTase	Frutosiltransferase	Y_{FOS}	Conversão da sacarose em FOS
M_o	Camada de água	ρ	Densidade (g/mL)
PEG	Poli(etileno glicol)		
R_{6m}^{Liof}	Atividade residual enzimática após 6 meses de estocagem		
R_o^{Liof}	Atividade residual liofilizada		

7- Referências Bibliográficas

- Aehle, W. (1990). **Enzymes in Industry: Production and Application**. 2nd Ed.; Wiley – VCH; The Netherlands.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (3), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** International Journal of Food Engineering, 6 (3), art. 9, DOI 10.2202/1556-3758.1894.
- Aguiar-Oliveira, E.; Rodrigues, M.I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase**. Current Chemical Biology, In the press.
- Alvarado-Huallanco, M.B. & Maugeri, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Blanch, H.W. & Clark, D.S. (1997). **Biochemical Engineering**. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Borole, A.P. & Davison, B.H. (2008). **Improving Activity of Salt-Lyophilized Enzyme in Organic Media**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 146, 215-222, DOI 10.1007/s12010-007-8033-y.
- Cabral, J.M.S.; Best, D.; Boross, L. & Tramper, J. (1994). **Applied Biocatalysis**, Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Carpenter, J.F.; Pikal, M.J.; Chang, B.S. & Randolph, T.W. (1997). **Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advices**. Pharmaceutical Research, 14 (8), 969-975.
- Chaplin, M.F. & Bucke, C. (1990). **Enzyme Technology**. Cambridge University Press.
- Costantino, H.R.; Curley, J.G.; Wu, S. & Hsu, C.C. (1998). **Water sorption behavior of lyophilized protein-sugar systems and implications for solid-state interactions**. International Journal of Pharmaceutics, 166, 211-221.
- Fágáin, C.Ó. (1997). **Stabilizing Protein Function**. Springer, Ireland.

- Gibson, T.D. & Woodward; J.R. (1993). **Enzyme stabilization**. US Patent: 5240843.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.
- Hirakura, Y.; Kojima, S.; Okada, A.; Yokohana, S. & Yokota, S. (2004). **The improved dissolution and prevention of ampoule breakage attained by the introduction of pretreatment into the production process of the lyophilized formulation of recombinant human Interleukin-11 (rhIL-11).** International Journal of Pharmaceutics, 286, 53-67.
- Kim, B.W.; Choi, J.W. & Yun, J.W. (1998). **Selective production of GF₄-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme.** Biotechnology Letters, 20 (11), 1031-1034.
- Kobayashi, S.; Beppu, K.; Shimizu, H.; Ogawa, S. & Kotani, R. (1984). **Stable enzyme composition**. US Patent: 4451569.
- Lee, M.Y. & Dordick, J. (2002). **Enzyme activation for nonaqueous media.** Current Opinion in Biotechnology, 13, 376-384.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** Journal of Biology and Chemistry, 193, 265-275.
- Maiorano, A.E.; Piccoli, R.M.; Silva, E.S. & Rodrigues, M.F.A. (2008). **Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pré-biotics.** Biotechnology Letters, 30, 1867-1877, DOI 10.1007/s10529-008-9793-3.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49, (1-6), 43-49.
- Mine, Y.; Fukunaga, K.; Yoshimoto, M.; Nakao, K. & Sugimura, Y. (2001). **Modification of Lipases with Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Oxyethylene) Detergents and Their Catalytic Activities in Organic Solvents.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 92 (6), 539-543.
- Morgan, J.A. & Clark, D.S.; **Salt-Activation of Nonhydrolase Enzymes for Use in Organic Solvents.** Biotechnology and Bioengineering, 85 (4), 456-459.
- Mosharraf, M.; Malmberg, M. & Fransson, J. (2007). **Formulation, lyophilization and solid-state properties of a pegylated protein.** International Journal of Pharmaceutics, 336, 215-232.
- Oetjen, G.W. & Haseley, P. (2004). **Freeze-Drying.** Second, Completely Revised and Extended Edition; Wiley-VCH; Germany.
- Partridge, J.; Halling, P.J. & Moore, B.D. (1998). **Practical route to high activity enzyme preparation for synthesis in organic media.** Chemical Communications, 7, 841-842.
- Roy, I. & Gupta, M.N. (2004). **Preparation of highly active α -chymotrypsin for catalysis in organic media.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14, 2191-2193.
- Roser, B. J. (1990). **Protection of proteins and the like.** US Patent: 4891319.
- Ru, M.T.; Wu, K.C.; Lindsay, J.P.; Dordick, J.S.; Reimer, J.A. & Clark, D.S. (2001). **Towards More Active Biocatalysts in Organic Media: Increasing the Activity of Salt-Activated Enzymes.** Biotechnology and Bioengineering, 75 (2), 187-197.
- Sangeetha, P.T.; Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2005). **Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides.** Trends in Food Science & Technology, 16, 442-457.
- Soares, M.P.; Rossi, A.A.R.; Mezzalira, A. & Cecim, M. (2002). **Ethylene Glycol on canine semen cryopreservation.** Ciência Rural, 32 (4), DOI 10.1590/S0103-84782002000400017.
- Sode, K. & Yasutake, N. (1997). **Preparation of lyophilized pyrroloquinoline quinine glucose dehydrogenase using trehalose as an additive.** Biotechnology Techniques, 11 (8), 577-580.
- Stewart, M.L.; Timm, D.A. & Slavin; J.L. (2008). **Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system.** Nutrition Research, 28, 329-334.
- Suzuki, N; Aiba, Y.; Takeda, H.; Fukumori, Y. & Koga, Y. (2006). **Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria.** Bioscience and Microflora, 25 (3), 109-116.
- Tang, W.L. & Zhao, H. (2009). **Industrial biotechnology: Tools and applications.** Biotechnology Journal, 4, 1725-1739.
- Tang, X. & Pikal, M.J. (2004). **Design of Freeze-Drying Process for Pharmaceuticals: Practical Advice.** Pharmaceutical Research, 21 (2), 191-200.

- Taralp, A. & Kaplan, H. (1997). **Nonaqueous Chemical Modification of Lyophilized Proteins**. In: Techniques in Protein Chemistry VIII, Editor D. R. Marshak, Academic Press, San Diego.
- Wang, Y. & Mei, L. (2007). **Lyophilization of Lipase with Cyclodextrins for Efficient Catalysis in Ionic Liquids**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103 (4), 345-349.
- William-Smith, D.L.; Bray, R.C.; Barber, M.J.; Tsopanakis, A.D. & Vincent, S. (1977). **Changes in Apparent pH on Freezing aqueous Buffer Solutions and their Relevance to Biochemical Electron-Paramagnetic-Resonance**. Biochemical Journal, 167, 593-600.

Effects of Lyophilization in the Catalytic Properties of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

Resumo

Conforme apresentado no Capítulo 8 sobre os resultados da liofilização da frutossiltransferase (FTase) extracelular e parcialmente purificada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 na sua forma livre, conduziu-se igualmente a liofilização desta enzima sob a forma imobilizada em nióbio, uma vez que existe um bom potencial de produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) em reatores empregando a enzima imobilizada. Observou-se que a liofilização da enzima imobilizada resultou, de forma geral, na manutenção da atividade enzimática após o processo, com um aumento de aproximadamente 6% no valor da atividade enzimática em liofilização conduzida sem aditivos. Assim como observado com a enzima livre no Capítulo 7, o efeito dos aditivos crio-protetores empregados individualmente foi melhor do que em formulações, sendo que a liofilização em tampão quatro vezes mais concentrado que o padrão para a FTase apresentou um atividade residual após 6 meses de estoque de 1,43 e a condição liofilizada padrão sem aditivos apresentou uma perda de 7%. Após este estoque a atividade de transfrutossilização do liofilizado padrão apresentou apenas uma pequena desaceleração cinética, especialmente quanto a produção de GF₄. Sob condições otimizadas de síntese (Capítulo 4) a cinética da enzima imobilizada liofilizada foi alterada como apresentado pela enzima livre liofilizada (Capítulo 7): a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) foi de 0,68 em 72 h e a composição de GF₄ chegou a ser 76% maior do que em comparação com a enzima imobilizada não liofilizada. A liofilização da FTase imobilizada mostrou-se eficaz quanto a preservação da atividade enzimática e necessitaria de estudos complementares sobre a conformação enzimática após a liofilização para um melhor entendimento dos efeitos da liofilização.

Effects of lyophilization in the catalytic properties of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

E. Aguiar-Oliveira & F. Maugeri

ABSTRACT

The partially purified extracellular fructosyltransferase (FTase) from *Rhodotorula* sp. LEB-V10, was immobilized on a niobium-graphite alloy and freeze dried (lyophilized) with and without additives, twelve additives commonly applied as crio-protectants were selected and evaluated individually and in formulation; the biocatalyst was then studied according to its catalytic properties. Lyophilization with or without additives did not affect significantly the immobilized enzyme and after a period of 6 months it was observed a reduction over the initial enzymatic activity of about 7 and 4% with the lyophilization just in sodium acetate buffer at 50 and 200 mM, respectively. The additives CMC, sorbitol, inositol and trehalose (at 2.5% w/v) and sodium acetate buffer at 100 mM also preserved individually the enzymatic activity after 6 months but the formulations evaluated resulted in 36 to 14% less enzymatic activity after 6 months. After lyophilization, FOS synthesis was changed by presenting around 68% of FOS yield between 72-96 h against the maximum yield of 58% at 24 h without lyophilization, the highest composition of 1^F-fructofuranosyl-nystose (GF₄) around 61% was observed after the lyophilization (76 times higher than with the condition not lyophilized).

Keywords: Adsorption, Enzyme Lyophilization, Freeze Drying, Fructooligosaccharides Synthesis, FTase, Niobium.

1- Introdução

Frutosiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) extracelular de *Rhodotorula* sp. LEB-V10, uma levedura isolada de flores da Mata Atlântica Brasileira (Maugeri & Hernalsteens, 2007) tem apresentado bom potencial de transfrutossilacção ao ser empregada parcialmente purificada e imobilizada por adsorção em nióbio, um suporte inorgânico sólido-ácido (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010; Alvarado-Huallanco & Maugeri-Filho, 2010; Hernalsteens & Maugeri, 2008) e com este biocatalisador tem sido possível obter conversões em torno de 58% da sacarose em FOS sob condições otimizadas (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011), em processos tradicionais utilizando frutosiltransferases de fungos filamentosos as conversões variam de 50 a 70% com enzimas purificadas. De acordo com Alvarado-Huallanco e Maugeri-Filho (2010) a conversão da sacarose em fruto-oligossacarídeos (FOS) – um açúcar prebiótico (Maiorano *et al.* 2008; Sangeetha *et al.*, 2005) – e a composição destes FOS foram semelhantes em sínteses empregando a enzima purificada e parcialmente purificada na forma imobilizada. Diversos estudos têm sido conduzidos com a frutosiltransferase de forma a fundamentar sua aplicação industrial com informações sobre sua estabilidade térmica, aplicação em biorreatores, otimização das condições de sínteses e, mais recentemente, sobre sua liofilização tanto na forma livre quanto imobilizada. O uso da enzima parcialmente purificada (precipitação com etanol a 70%) reduz os custos com sua obtenção e conforme resultados obtidos com a liofilização da frutosiltransferase parcialmente purificada e na forma livre (dados ainda não publicados), a presença de outras proteínas - devido a purificação parcial - indica proteger a enzima livre durante a liofilização. Maiores informações sobre o suporte nióbio podem ser obtidas em Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010).

A liofilização é um dos mais conhecidos processos de preservação empregados e consiste da remoção da água congelada de proteínas ou células em suspensão por sublimação (Aehle, 1990; Blanch & Clark, 1997; Cabral *et al.*, 1994; Chaplin & Bucke, 1990), este processo é altamente indicado se há um valor comercial agregado à proteína em questão porque facilita seu transporte/distribuição, estocagem, uso, etc. (tanto para fins farmacêuticos quanto alimentícios) mesmo sendo uma técnica de grande gasto energético e de tempo de preparo (Carpenter *et al.*, 1997; Fágáin, 1997; Roy & Gupta, 2004; Tang & Pikal, 2004;

Partridge *et al.*, 1998;). No entanto, existem relatos sobre os benefícios da liofilização - em presença de aditivos estabilizantes - de proteínas imobilizadas em diferentes matrizes/suportes como: matrizes porosas (p.e. celulose ou papel a base de vidro, filme plástico poroso ou um tecido, etc.) impregnado com trealose (Roser, 1990), fibra de celulose ou poliacrilamida como citado por Gibson e Woodward (1993) e a patente EP140489A da Wako[®] Chemical Industries sugere a imobilização de anticorpos em esferas de vidro. Conforme citado em Cabral *et al.* (1994), a utilização de pós liofilizados pode levar a problemas de dissolução como agregação nas paredes do biorreator, portanto, a imobilização, especialmente a adsorção por sua simplicidade, seria uma opção viável.

Para Cao (2005) a liofilização de enzimas previamente imobilizadas, com (co-liofilização) ou sem aditivos, é uma técnica muito aplicada pois é bem sucedida quanto ao aumento da estabilidade térmica e até mais vantajosa do que outras técnicas pós-imobilização. Este autor cita ainda que alguns pesquisadores observaram que, lavando certas enzimas co-liofilizada para retirar o aditivo da liofilização a atividade enzimática imobilizada normalmente permanece a mesma, no entanto, com protease e lipase co-liofilizadas a remoção do sorbitol reduziu a atividade.

Partridge *et al.* (1998) empregaram uma metodologia em que α -quimotripsina é primeiramente imobilizada por adsorção em sílica gel e “seca” por lavagens repetidas com *n*-propanol como metodologia alternativa para evitar a perda de atividade enzimática obtida após a liofilização e de acordo com os autores, a imobilização pode dispersar a enzima sobre uma vasta área superficial resultando numa boa acessibilidade ao sítio ativo; este estudo demonstrou que o uso da enzima em meio orgânico após ser “seca” com *n*-propanol necessita de baixos níveis de água para promover a catálise (máximo com $A_w = 0,40$), e por outro lado, baixas taxas catalíticas foram observadas acima de $A_w = 0,60$ sugerindo que para a forma liofilizada um processo de reorganização induzido pelo conteúdo de água é necessário para converter a enzima de volta a sua estrutura nativa. Esse trabalho em particular reflete a grande importância que a água apresenta sobre enzimas “seca” ou liofilizada com base no histórico de remoção da água envolvido.

Em estudo conduzido por Würges *et al.* (2005) discute-se a utilização de 98,5 % p/p de *fumed silica* (FS) com a subtilisina Carlsberg antes da liofilização; a enzima sem

aditivos obtida após a liofilização apresentou aspecto de “folhas”, algumas das quais apresentou espessura da ordem de micrometros. Como este liofilizado tinha por objetivo ser empregado em hexano, ele não se dissolve e a enzima contida no interior das “folhas” estaria inutilizada, mas com o uso da *fumed sílica* (FS), as partículas resultantes foram muito menores. Para os autores, o preparado resultante de partículas de FS não porosas com a enzima depositada em sua superfície possui uma espessura de camada muito menor do que a apresentada pela enzima livre (sem aditivos) liofilizada e dessa forma é mais ativa, ou seja, a atividade catalítica de um preparado enzimático deve aumentar quando a quantidade relativa de enzima por superfície de área disponível é aumentada.

Persson *et al.* (2002) avaliou a imobilização de uma lipase em polipropileno Accurel[®] EP-100 macroporoso seguida da liofilização, em concentrações maiores do tampão fosfato, especificamente 200 mM e foi possível obter um aumento da atividade catalítica em 7 vezes em comparação com a enzima livre liofilizada. Estes autores afirmam ainda que alguns aditivos empregados na liofilização podem servir como matrizes para as enzimas e o aumento da atividade enzimática após imobilização e liofilização pode ser devido a limitações difusionais. Com base nos resultados obtidos, os autores afirmam que o uso do tampão mais concentrado promoveu a imobilização da enzima no próprio sal do tampão (considerando preparados de 100 mg de protein por g de liofilizado).

Os aditivos mais frequentemente empregados em liofilizações podem ser classificados em cinco grupos de acordo com Oetjen e Haseley (2004): proteínas (p.e. albumina do sôro humano, gelatina), aminoácidos (p.e. glicina), álcoois (p.e. manitol, PEG), carboidratos (p.e. glicose, trealose, dextrana) e outros (p.e. metais, surfactantes, polímeros, sais tamponantes). As formulações empregadas em liofilização devem sempre levar em consideração o uso final do produto e devem aumentar a estabilidade e preservação contra contaminação microbiana, evitar precipitações físicas ou facilitar a dissolução além de otimizar critérios estéticos como cor e odor (Aehle, 1990). Uma enzima liofilizada é vendida em função da sua atividade final e muitas enzimas industriais contém relativamente pouca quantidade de sítios ativos no produto final (< 10% p/p) sendo o restante do peso composto por estabilizadores, preservadores, sais e diluentes para padronização entre bateladas de diferentes atividades específicas (Chaplin & Bucke, 1990).

2- Materiais e Métodos

A obtenção da frutossiltransferase extracelular e parcialmente purificada do meio de cultivo de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 procedeu-se conforme descrito em trabalho de Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010) onde também se encontra descrita a metodologia para imobilização da enzima por adsorção em nióbio, assim como as metodologias necessárias para a determinação da atividade enzimática imobilizada, sínteses de FOS, e identificação e quantificação por HPLC-PAD dos açúcares provenientes das sínteses de FOS [sacarose (GF), glicose (G), frutose (F), 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄)].

2.1- Seleção dos aditivos

Os aditivos avaliados foram selecionados conforme relatos da literatura: polietileno glicol (PEG 6000), carboximetil celulose (CMC), etileno glicol, manitol, glicerol, sulfato de amônia, sorbitol, inositol, xilitol, trealose além do tampão acetato de sódio (pH 4,5) em concentrações maiores que a concentração ótima para a frutossiltransferase (50 mM): 100 e 200 mM. Estes compostos foram adquiridos de marcas conceituadas e disponíveis no mercado.

Numa primeira etapa cada aditivo foi avaliado individualmente a uma concentração de 2,5% (p/p) com a frutossiltransferase imobilizada. Após a análise do efeito individual dos aditivos, foram testadas combinações entre: CMC, sorbitol, xilitol, trealose e sulfato de amônia (todos a 1,25% p/p) em formulações tendo como meio de diluição tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5.

2.2- Preparo das amostras e etapas de análises

Na primeira etapa de avaliação individual do efeito de cada aditivo, todos os liofilizados foram realizados em duplicata, cada um com: cerca de 4,0 g (3,0 g enzima imobilizada + 1 mL tampão). Com a frutossiltransferase imobilizada, os aditivos foram devidamente diluídos em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 e depois adicionados a 3,0 g (peso úmido) de enzima imobilizada. Nesta etapa os aditivos foram avaliados nas concentrações de 2,5% (p/p), considerando o peso do biocatalisador imobilizado como base, apenas o CMC foi avaliado também a 1,25% (p/p).

Após a seleção dos aditivos de melhores desempenhos individuais sobre a enzima imobilizada e liofilizada foram definidas quatro formulações contendo dois aditivos para a enzima imobilizada tendo como meio de dispersão tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 (vide Tabelas 1 e 4). Nesta segunda etapa, o preparo das amostras foi conduzido de forma semelhante aos primeiros testes, em duplicata. A concentração de cada aditivo na formulação foi de 1,25% (p/v).

Com base em resultados obtidos em estudos anteriores (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011) o estudo do efeito de uma pré-ativação antes da liofilização da enzima imobilizada, obtida através de 15 min de incubação a 52 ou 60°C seguida de banho de gelo, foi realizado com a enzima imobilizada. A incubação foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM em dois pHs : 4,5 e 6,0.

2.3- Liofilização da frutosiltransferase imobilizada em nióbio

Todas as amostras após serem devidamente preparadas foram congeladas a -60°C em um ultra-freezer por cerca de 18 h antes de proceder à liofilização. Após este primeiro congelamento as amostras foram liofilizadas por 24 h em um liofilizador de bancada do tipo Terroni[®] modelo Interprise 1, onde foram resfriadas a aproximadamente -55 °C por um compressor hermético com ventilação forçada (ar) e utilizando uma bomba a vácuo de 5/370 (CFM/W). As tortas liofilizadas foram cuidadosamente desfeitas com o auxílio de uma bagueta de vidro. Os liofilizados obtidos foram estocados em freezer (-20°C), em frascos de vidro comum sem fechamento a vácuo, até que todas as análises tivessem sido feitas num tempo inicial, que não ultrapassou 1 semana após a liofilização (t = 0), e após 6 meses de estoque (t = 6 m) para análise da *shelf-life*.

2.4- Caracterização dos liofilizados

A determinação da atividade enzimática dos liofilizados da enzima imobilizada e as sínteses de FOS foram conduzidas a partir de 0,25 g do liofilizado final. As sínteses de FOS padrão foram realizadas sob as condições de: 50°C, 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio em pH 4,5.

As condições padrão para análise dos liofilizados com aditivo ou em formulações equivalentes aos imobilizados não liofilizados. Os liofilizados obtidos foram caracterizados,

principalmente, quanto a: atividade enzimática residual liofilizada (Eq. 01), atividade residual térmica liofilizada (Eq. 02), atividade enzimática específica liofilizada (Eq.03), conversão da sacarose em FOS (Eq.04), concentração específica dos FOS (Eq.05) e *shelf-life*.

a) Atividade Residual Liofilizada (R_o^{Liof}): expressa pela Equação 01 sendo, U_i^{Liof} a atividade enzimática immobilizada da amostra e U_i^o a atividade enzimática padrão não liofilizada.

$$R_o^{Liof} = \frac{U_i^{Liof}}{U_i^o} \quad (01)$$

b) Atividade Residual Térmica Liofilizada ($R^{Liof.65^\circ C}$): expressa pela Equação 02, sendo $U_i^{Liof.65^\circ C}$ a atividade enzimática immobilizada liofilizada após incubação a 65°C por 15 minutos, seguida de banho de gelo e U_i^{Liof} a atividade desta mesma amostra antes do tratamento térmico.

$$R^{Liof.65^\circ C} = \left(\frac{U_i^{Liof.65^\circ C}}{U_i^{Liof}} \right) \quad (02)$$

1,0 g do biocatalisador immobilizado foi submetido a incubação a 65°C/15min em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5 sendo retirados 0,25 g para a determinação da atividade enzimática.

c) Atividade Enzimática Específica Liofilizada ($*U_{pm}^{Liof}$): expressa pela Equação 03 (U_i/mg), sendo a razão entre a atividade enzimática immobilizada liofilizada e o valor de proteína (mg) immobilizada determinada pelo método de Lowry (1951). Para o biocatalisador immobilizado a proteína foi determinada pela diferença entre a proteína total oferecida inicialmente à adsorção (presente no meio de dispersão) e a proteína não adsorvida ao final do processo de imobilização (presente no meio de lavagem do biocatalisador ao final da imobilização).

$$*U_{pm}^{Liof} = \frac{U_i^{Liof}}{mg} \quad (03)$$

d) Conversão da Sacarose em FOS (Y_{FOS}): expressa pela Equação 04, sendo [FOS] a concentração dos fruto-oligossacarídeos totais obtidos (g/L) partindo-se de uma

concentração inicial de sacarose de 500 g/L. Amostras de 200 µL foram coletadas das sínteses em diferentes tempos e analisadas por cromatografia de íons (HPLC-PAD) conforme metodologia descrita em trabalho anterior (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010).

$$Y_{FOS} = \frac{[FOS]}{[500 \text{ g / L}]} \quad (04)$$

e) Produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}): expressa pela Equação 05 ($mg/U_i^{Liof} \cdot h, mg/U_i \cdot h$), sendo obtida pela razão entre a concentração dos FOS totais obtidos (mg/mL) e a concentração da atividade enzimática imobilizada utilizada na síntese ($U_i^{Liof} / ml, U_i / ml$) e tempo de síntese decorrido (h).

$$Pr_{FOS} = \frac{[FOS]}{(U/ml)(h)} \quad (05)$$

f) Atividade de água (A_w): o liofilizado simples padrão da enzima imobilizada teve sua atividade de água (A_w) determinada a 25°C no tempo zero (logo após a liofilização) e após 6 meses de estoque refrigerado (-20°C). As leituras foram feitas em triplicata em um AquaLab Serie 3TE, Decagon Devices Inc. (EUA).

3- Resultados e Discussão

Após a imobilização da frutossiltransferase por adsorção em nióbio, o biocatalisador obtido apresentou uma atividade de $16,08 \pm 2,07 U_i$ e foi utilizado em todos os testes de liofilização desta primeira etapa de avaliação individual dos aditivos, os resultados são apresentados na Tabela 1. A Figura 1 apresenta uma comparação visual entre partículas limpas de nióbio e o imobilizado liofilizado, a diferenciação visual é praticamente impossível devido a cor cinza escuro do nióbio. A atividade de água das partículas limpas (sem enzima adsorvida) foi determinada como $A_w = 0,442 \pm 0,001$ e o imobilizado liofilizado apresentou uma atividade de água logo após a liofilização (tempo zero) de $A_w = 0,230 \pm 0,001$.

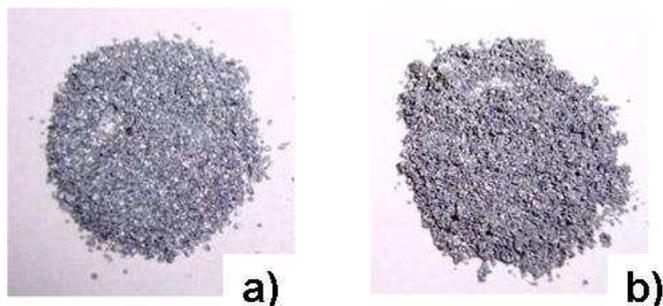


Figura 1: **a)** Partículas limpas de nióbio ($A_w = 0,442 \pm 0,001$) com tamanho de partícula selecionado entre 65-80 Mesh (212-180 μm); **b)** Liofilizados simples da frutossiltransferase parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 ($A_w = 0,230 \pm 0,001$).

3.1- Estudo dos efeitos individuais dos aditivos

Após a liofilização da frutossiltransferase imobilizada, a atividade residual liofilizada (R_o^{Liof}) mostrou um aumento no valor da atividade enzimática em aproximadamente 6%. Efeitos positivos sobre a atividade enzimática imobilizada após a liofilização ($R_o^{Liof} > 1,0$) foram observados com quase todos os aditivos avaliados, conforme apresentado na Tabela 1, exceto pelas condições em tampão acetato de sódio 100 e 200 mM e etileno glicol (2,5% v/p); o maior valor obtido para a atividade residual liofilizada com a enzima imobilizada foi o aditivo CMC a 2,5% (p/p) ($R_o^{Liof} = 1,74$).

Ao analisar os valores da atividade residual térmica da enzima imobilizada liofilizada ($R^{Liof.65^\circ\text{C}}$) contidos na Tabela 1, é possível observar que a liofilização da enzima imobilizada sem nenhum aditivo (padrão) apresentou uma atividade residual térmica 1,3 vezes maior que a apresentada pela enzima imobilizada não liofilizada; o etileno glicol e tampão acetato de sódio 100 e 200 mM – ambos resultaram nos piores efeitos sobre a atividade residual (R_o^{Liof}) e nas maiores estabilidades térmicas ($R^{Liof.65^\circ\text{C}} > 0,3$) obtidas.

A atividade enzimática específica liofilizada ($*U_{pm}^{Liof}$) resultou num aumento de apenas 5% em seu valor após a liofilização da enzima imobilizada sem aditivos, conforme mencionado anteriormente, a enzima é empregada na forma parcialmente purificada o que significa que a proteína total determinada não é exclusivamente relacionada à enzima. As

condições de maiores R_o^{Liof} resultaram consequentemente nos maiores valores de $*U_{ptn}^{Liof}$ (Tabela 1).

Table 1: Caracterização da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em presença e ausência de aditivos estabilizantes. Os parâmetros de caracterização considerando 1 g de liofilizado foram: atividade enzimática imobilizada residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática imobilizada residual térmica liofilizada ($R^{Liof.65^\circ C}$), atividade enzimática imobilizada específica liofilizada [$*U_{ptn}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS após 24 h [Y_{FOS}] e produtividade após 24 h [Pr_{FOS} ; mg/U.h].

FTase Imobilizada (não liofilizada)	U_i /g	$R^{65^\circ C}$ ($U_i^{65^\circ C}/U_i^o$)	$*U_{ptn}$ (U_i /mg ptn.)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
	16,08 ± 2,07	0,16 ± 2,9E ⁻²	4,30 ± 0,10	0,10	0,90
Imobilizados / Liofilizados sem aditivos meio de dispersão: tampão acetato de sódio em pH 4,5					
Conc. do tampão	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq.03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
50 mM (padrão)	1,06 ± 0,14	0,21 ± 2,2E ⁻²	4,52 ± 0,11	0,14	1,17
100 mM	0,82 ± 0,03	0,41 ± 6,4E ⁻⁴	3,52 ± 0,06	0,06	0,63
200 mM	0,94 ± 0,09	0,37 ± 3,3E ⁻²	4,03 ± 0,10	0,04	0,35
Imobilizados / Liofilizados sem aditivos meio de dispersão: tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5					
Aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq. 03)	Y_{FOS} (24h) (Eq.04)	Pr_{FOS} (24h) (Eq.05)
CMC 2,5% (p/p)	1,74 ± 0,18	0,20 ± 1,6E ⁻³	7,45 ± 0,16	0,11	0,56
CMC 1,25% (p/p)	1,35 ± 0,24	0,24 ± 2,2E ⁻²	5,76 ± 0,13	0,06	0,40
Etileno glicol 2,5% (v/p)	0,39 ± 0,08	0,63 ± 9,0E ⁻²	1,65 ± 0,06	0,01	0,24
Glicerol 2,5% (p/p)	1,39 ± 0,09	0,24 ± 1,6E ⁻²	5,96 ± 0,13	0,11	0,66
Inositol 2,5% (p/p)	1,29 ± 0,19	0,15 ± 2,0E ⁻²	5,48 ± 0,10	0,07	0,44
Manitol 2,5% (p/p)	1,69 ± 0,21	0,27 ± 1,3E ⁻²	7,22 ± 0,17	0,08	0,39
PEG 6000 2,5% (p/p)	1,45 ± 0,29	0,23 ± 1,6E ⁻²	6,16 ± 0,18	0,08	0,46
Sorbitol 2,5% (p/p)	1,39 ± 0,13	0,25 ± 2,7E ⁻²	5,93 ± 0,14	0,20	1,28
Sulfato de amônia 2,5%(p/p)	1,41 ± 0,23	0,24 ± 3,9E ⁻³	5,99 ± 0,09	0,12	0,76
Trealose 2,5% (p/p)	1,51 ± 0,10	0,28 ± 1,4E ⁻³	6,46 ± 0,16	0,08	0,48
Xilitol 2,5% (p/p)	1,62 ± 0,31	0,20 ± 1,8E ⁻²	6,89 ± 0,19	0,07	0,39

Dentre as sínteses realizadas com os imobilizados liofilizados, a adição de sorbitol forneceu o maior valor de conversão da sacarose ($Y_{FOS} = 0,20$) valor este duas vezes maior que o obtido com o imobilizado não liofilizado; a adição de etileno glicol foi a de pior

resultado dentre todas as condições analisadas. A produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) apresentada pela frutossiltransferase imobilizada e liofilizada foi cerca de 23% maior que sua condição padrão não liofilizada; como reflexo do valor de Y_{FOS} , o sorbitol apresentou a maior produtividade específica (Tabela 1).

3.1.a- Avaliação dos liofilizados simples após 6 meses de estoque a -20°C

Após 6 meses de estoque a -20°C, foi possível observar um aumento na atividade de água do liofilizado padrão simples, sua atividade de água foi de $A_w = 0,402 \pm 0,001$, o que representa um aumento de quase 75% em comparação com o tempo zero. Muitos autores ressaltam que o estoque de liofilizados deve ser feito de preferência em ampolas de vidro lacradas que impediriam a reabsorção de água ao longo do tempo e que, além disso, a solução a ser liofilizada não deveria ocupar mais do que 20% do recipiente (Everse & Stolzenbach, 1971; Oetjen & Haseley, 2004) mas neste estudo aqui apresentado os imobilizados liofilizados foram obtidos e estocados em vidros comuns (10 mL) e sem vácuo pois assim, avaliaria-se o efeito do estoque sob condições não otimizadas.

Após 6 meses de estocagem a -20°C alguns dos imobilizados liofilizados provenientes da análise dos efeitos individuais de cada composto (Tabela 1), foram avaliados quanto a manutenção da atividade enzimática em relação a sua atividade inicial sob a forma de atividade residual de estocagem ($R_{6m}^{Liof} = U_i^{Liof(t=6meses)} / U_i^{Liof(t=0)}$). Dentre todas as condições analisadas no item anterior, apenas a condição com aditivo etileno glicol não foi selecionada para esta análise devido ao seu baixo valor de R_o^{Liof} já no tempo zero (Tabela 1). Os resultados obtidos para R_{6m}^{Liof} estão apresentados na Tabela 2.

Alguns compostos analisados foram capazes de proporcionar um aumento da atividade enzimática liofilizada após 6 meses de estoque e isso pode ser explicado pela reabsorção de água ao longo do tempo, que conferiria uma maior flexibilidade às moléculas, mas estudos mais específicos sobre a conformação da enzima necessitariam ser feitos para confirmação. Após 6 meses de estoque, o imobilizado liofilizado sem aditivos apresentou uma perda de 7% de sua atividade inicial (Tabela 2), sendo sua atividade enzimática após 6 meses de $15,61 U_i^{Liof} / g$; quando o meio de dispersão utilizado foi o tampão com concentração de 100 mM a perda foi de 5% da atividade e com a concentração de 200 mM

a atividade residual de estoque apresentou um aumento de 43% após os 6 meses de estoque. Dentre os outros liofilizados avaliados após 6 meses de estoque refrigerado (Tabela 2) foi observado com alguns aditivos a obtenção de uma atividade residual de estocagem maior que 1,0: sorbitol (1,38), inositol (1,17), trealose (1,08) e CMC (1,06).

Tabela 2: Análise da atividade residual liofilizada de estocagem (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estoque em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 1) da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. A condição liofilizada padrão simples apresentou atividade enzimática após 6 meses de estoque de $15,61 U_i^{Liof} / g$.

Imobilizado / Liofilizado sem aditivos <u>meio de dispersão: tampão acetato de sódio</u> <u>em pH 4,5</u>	
Concentração do tampão	R_{6m}^{Liof} ^a
50 mM (padrão)	0,93
100 mM	0,95
200 mM	1,43
Imobilizado / Liofilizado <u>meio de dispersão: tampão acetato de sódio</u> <u>50 mM e pH 4.5</u>	
Aditivos	R_{6m}^{Liof} ^a
CMC 2,5% (p/p)	1,06
CMC 1,25% (p/p)	0,99
Glicerol 2,5% (p/p)	0,71
Inositol 2,5% (p/p)	1,17
Manitol 2,5% (p/p)	0,57
PEG 6000 2,5% (p/p)	0,86
Sorbitol 2,5% (p/p)	1,38
Sulfato de amônia 2,5% (p/p)	0,72
Trealose 2,5% (p/p)	1,08
Xilitol 2,5% (p/p)	0,85

$$^a R_{6m}^{Liof} = U_i^{Liof(t=6meses)} / U_i^{Liof(t=0)}$$

O liofilizado sem aditivos (padrão – concentração do tampão de 50 mM) estocado por 6 meses foi utilizado em uma síntese de FOS com o objetivo de se avaliar o efeito isolado da estocagem sobre a capacidade biocatalítica; a conversão da sacarose em FOS, a concentração específica dos FOS e a composição percentual dos FOS obtidos: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄) estão demonstrados na Tabela 3. Os resultados apresentados nesta Tabela 3 demonstram que mesmo após 6 meses de estoque, a

frutosiltransferase imobilizada conservou sua atividade de transfrutoseilação, apesar de uma baixa composição percentual de GF₄; por comparação, com a mesma concentração enzimática e condições de síntese, após 72 h é possível obter com a enzima imobilizada não liofilizada um Y_{FOS} de 0,52 (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2010) e consequentemente uma produtividade específica de FOS neste mesmo tempo de 0,60 mg/U_i.h (mesmo valor apresentado na Tabela 3 com o liofilizado estocado – concentração do tampão: 50 mM). Para o liofilizado estocado, a conversão da sacarose foi gradualmente aumentada com o tempo de reação chegando a um valor de 0,55 após 72 h o que equivale a uma concentração de FOS totais de aproximadamente 275 g/L.

Tabela 3: Sínteses realizadas com os liofilizados obtidos em tampão acetato de sódio: 50 e 200 mM (pH 4,5) sem aditivos com a frutosiltransferase parcialmente purificada e imobilizada *Rhodotorula* sp. LEB-V10. Os liofilizados foram estocados a -20°C por 6 meses sínteses de FOS foram conduzidas nas condições de: 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, 50°C e 6,31 U_i/mL. Avaliou-se a conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), a produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}; mg/U_i.h) e a composição percentual de cada FOS obtido: 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-frutofuranosil-nistose (GF₄).

Imobilizado / Liofilizado (sem aditivos) após 6 meses								
Concentração do tampão	50 mM				200 mM			
	3 h	24 h	48 h	72 h	3 h	24 h	48 h	72 h
Y _{FOS}	0,05	0,34	0,49	0,55	0,02	0,19	0,31	0,39
% GF ₂	100	86,4	70,6	67,0	100	95,7	82,5	74,6
% GF ₃	-	13,6	28,8	32,6	-	4,3	17,46	23,9
% GF ₄	-	-	0,6	0,4	-	-	-	1,4
Pr _{FOS}	1,41	1,11	0,80	0,60	0,50	0,62	0,51	0,43

3.2- Estudo de formulações para liofilização

Com base nos resultados individuais de cada aditivo algumas considerações foram feitas para seleção dos componentes das formulações para liofilização da frutosiltransferase imobilizada em nióbio. O tampão a 200 mM foi escolhido devido ao fato de ter apresentado um efeito individual significativo com a liofilização da enzima na sua forma livre (dados ainda não publicados) e adicionalmente pela capacidade de preservar a atividade enzimática após 6 meses de estoque (Tabela 2). O aditivo CMC individualmente levou a uma das maiores atividade imobilizada residual liofilizada (Tabela 1) sendo selecionado para as

formulações como agente de volume. Sulfato de amônia, inositol, sorbitol, xilitol e trealose também foram selecionados devido aos seus efeitos sobre a atividade imobilizada liofilizada residual. Os aditivos CMC, sulfato de amônia e sorbitol apresentaram uma conversão da sacarose (Y_{FOS}) maior que o apresentado pela enzima imobilizada sem liofilizar. Por estas razões estes compostos foram utilizados em quatro formulações diferentes; Carpenter *et al.* (1997) defende que as formulações para liofilizados sejam mantida com o menor número possível de componentes pois o efeito pode vir a ser indesejado. As formulações e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Sobre a atividade residual imobilizada liofilizada (R_o^{Liof}) dos formulados avaliados (Tabela 4) é possível afirmar que maiores efeitos foram obtidos na primeira etapa de análise individual de cada aditivo (Tabela 1). As quatro formulações avaliadas com a frutossiltransferase imobilizada praticamente não revelaram diferenças entre si em comparação com o padrão não liofilizado, com variações em R_o^{Liof} entre +0,06 e -0,05.

A análise da atividade imobilizada residual térmica ($R^{Liof.65^\circ C}$) revela que a liofilização foi benéfica à estabilidade térmica da frutossiltransferase imobilizada sem aditivos e sob a formulação [CMC + xilitol] cujos valores de $R^{Liof.65^\circ C}$ foram cerca de 1,2 e 1,4 vezes maiores que o valor obtido com a enzima imobilizada sem liofilizar (Tabela 4). Em comparação com o efeito individual dos compostos (Tabela 1) é possível observar que os valores de $R^{Liof.65^\circ C}$ obtidos com as formulações foram menores. Dentre os formulados, o menor valor obtido para a estabilidade térmica foi com o formulado [CMC + trealose], mesmo contendo trealose um composto bastante indicado e utilizado como termo-estabilizante em processos de liofilização (Carpenter *et al.*, 1997; Cabral *et al.*, 2004; Fágáin, 1997; Roser, 1990; Ru *et al.*, 2001; Sode & Yasutake, 1997).

Com relação à atividade enzimática imobilizada específica liofilizada ($^*U_{\rho m}^{Liof}$) os valores obtidos com os formulados foram muito próximos entre si e, em termos, menores que os obtidos no estudo individual dos compostos (Tabela 1).

Tabela 4: Caracterização de liofilizados formulados da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10. Os parâmetros de caracterização para 1 g de liofilizado, foram: atividade enzimática residual liofilizada [R_o^{Liof}], atividade enzimática residual térmica [$R^{Liof.65^\circ C}$], atividade enzimática liofilizada específica [$*U_{ptn}^{Liof}$], conversão da sacarose em FOS [Y_{FOS}] e produtividade após 72 h de sínteses [Pr_{FOS} ; mg/ U_i .h].

FTase Imobilizada (não liofilizada)	U_i^0/g	$R^{65^\circ C}$ ($U_i^{65^\circ C}/U_i^0$)	$*U_{ptn}$ ($U_i/mg\ ptn.$)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
		37,42 ± 0,20	0,17 ± 0,02	4,66 ± 0,02	0,42 ± 0,04
Imobilizado / Liofilizado meio de dispersão: tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5					
Liofilizado padrão sem aditivos	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
	1,02 ± 0,04	0,21 ± 0,01	4,73 ± 0,19	0,45 ± 0,01	1,65 ± 0,04
Formulados Composição (% p/p)	R_o^{Liof} (Eq. 01)	$R^{Liof.65^\circ C}$ (Eq. 02)	$*U_{ptn}^{Liof}$ (Eq. 03)	Y_{FOS} (72h) (Eq. 04)	Pr_{FOS} (72h) (Eq. 05)
CMC (1,25%) + sorbitol (1,25%)	0,98 ± 0,05	0,10 ± 0,01	4,56 ± 0,20	0,43 ± 0,01	1,61 ± 0,03
CMC (1,25%) + xilitol (1,25%)	0,95 ± 0,05	0,24 ± 0,03	4,44 ± 0,27	0,49 ± 0,06	1,91 ± 0,22
CMC (1,25%) + trealose (1,25%)	1,04 ± 0,04	0,07 ± 0,01	4,86 ± 0,17	0,40 ± 4,2.E ⁻³	1,43 ± 0,01
CMC (1,25%) + sulfato de amônia (1,25%)	1,06 ± 0,09	0,09 ± 0,02	4,93 ± 0,38	0,59 ± 0,03	2,06 ± 0,12

As sínteses de FOS apresentaram com 72 h de síntese um acréscimo de apenas 7% à conversão da sacarose (Y_{FOS}) após a liofilização da enzima imobilizada tampão acetato de sódio a 200 mM sem aditivos. Dentre as formulações avaliadas, o melhor de todos os resultados foi obtido com a formulação [CMC + sulfato de amônia] cujo valor de Y_{FOS} foi de 0.59 (31% maior que seu liofilizado padrão) e a composição dos FOS obtidos foi de quase totalidade de 1-kestose (GF_2) e nistose (GF_3) (dados não apresentados).

Considerando a produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) foi possível obter valores maiores do que os observados na primeira etapa de avaliação individual dos aditivos (Tabela 1). A liofilização da enzima imobilizada em nióbio e em tampão acetato 200 mM (liofilizado padrão) apresentou uma produtividade específica de $1,65 \text{ mg}/U_i^{Liof} \cdot h$ e a condição não liofilizada de $1,59 \text{ mg}/U_i \cdot h$ (equivalentes a 3,14 e 2,98 g/L.h, respectivamente). A formulação [CMC + sulfato de amônia] apresentou o maior valor de Pr_{FOS} , cerca de 22% maior que o imobilizado não liofilizado (Tabela 4).

3.2.a- Análise dos imobilizados liofilizados formulados após 6 meses de estocagem refrigerada (-20°C)

Os formulados liofilizados foram analisados após 6 meses de estoque refrigerado (-20°C) quanto à manutenção da atividade enzimática liofilizada após o estoque (R_{6m}^{Liof}), os resultados estão apresentados na Tabela 5, onde pode-se observar que, nenhuma das formulações avaliadas apresentou atividade enzimática residual de estoque maior que 0,90, como observado no estudo dos efeitos dos aditivos individualmente (Tabela 2). A condição liofilizada sem aditivos apresentou uma atividade enzimática imobilizada liofilizada de $35,87 \pm 0,98 U_i^{Liof} / g$ após 6 meses. Se compararmos os dois liofilizados sem aditivos e estocados, mas obtidos em tampões de diferentes concentrações (50 mM: Tab. 2 / 200 mM: Tab 5), é possível observar uma aumento em cerca de 3% no valor de R_{6m}^{Liof} com o liofilizado padrão obtido em tampão 200 mM. A formulação de melhor manutenção da atividade (R_{6m}^{Liof}) foi a formulação contendo CMC e sulfato de amônia.

O liofilizado padrão (sem aditivos) obtido em tampão acetato de sódio 200 mM com *shelf-life* de 6 meses foi então aplicado em síntese de FOS para que o efeito da estocagem e da liofilização pudessem ser avaliados sobre a capacidade biocatalítica do biocatalisador, os

resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Comparando-se as duas sínteses realizadas com os dois imobilizados liofilizados (sem aditivos) e estocados - cuja diferença é a concentração do meio de dispersão utilizado: 50 e 200 mM - é possível observar que a conversão da sacarose foi bem menor com o liofilizado imobilizado em tampão acetato 200 mM. Após 72 h de síntese o liofilizado estocado (200 mM) apresentou um Y_{FOS} cerca de 29% menor em comparação com o liofilizado estocado (50 mM). Mesmo tendo apresentado uma aumento de 3% na atividade residual após 6 meses de estoque, o tampão com concentração de 200 mM não aumentou a capacidade biocatalítica do imobilizado liofilizado sem aditivos pois, após 72 h de síntese, uma unidade de atividade enzimática imobilizada e liofilizada apresentou uma produtividade de FOS 28% menor que a condição obtida em tampão menos concentrado (Tabela 3: Pr_{FOS}).

Tabela 5: Análise da atividade residual liofilizada de estocagem (R_{6m}^{Liof}) após 6 meses de estoque a $-20^{\circ}C$ em comparação com a atividade enzimática no tempo zero (Tabela 4) da frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 liofilizada em formulações. A condição imobilizada liofilizada padrão (sem aditivos) apresentou após 6 meses uma atividade enzimática de: $35,87 \pm 0,98 U_i^{Liof} / g$. O diluente utilizado para obtenção dos liofilizados foi tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5.

Liofilizado Padrão (sem aditivos)	R_{6m}^{Liof} ^a
	0,96 ± 0,02
Formulados	R_{6m}^{Liof} ^a
CMC + sorbitol	0,75 ± 0,04
CMC + xilitol	0,73 ± 0,03
CMC + trealose	0,64 ± 0,05
CMC + sulfato de amônia	0,86 ± 4,7E ⁻⁴

$$^a R_{6m}^{Liof} = U_i^{Liof(t=6\text{meses})} / U_i^{Liof(t=0)}$$

3.3- Avaliação sobre o efeito da pré-incubação a 52 e 60°C antes da liofilização

Conforme resultados apresentados com a frutossiltransferase imobilizada em nióbio em trabalho prévio (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011) após uma incubação de 15 minutos em tampão acetato de sódio 50 mM e pHs 4,5 e 6,0 em diferentes temperaturas foi observada uma ativação da enzima imobilizada nas temperaturas de 52 and 60°C, sendo as maiores

ativações observadas em 52°C com pH 4,5 (mais de 80% de ativação) e pH 6,0 (50% de ativação). Dessa forma, a pré-incubação da enzima imobilizada foi realizada nas duas temperaturas e nos dois valores de pH mencionados para que pudesse ser avaliado o efeito desse pré-tratamento e se a ativação seria mantida após a liofilização. Um imobilizado de atividade $31,78 \pm 0,01$ U_i/g foi utilizado e a liofilização foi conduzida em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5.

Em estudo anterior a pré-incubação não forneceu um aumento acumulativo da estabilidade térmica da enzima imobilizada (Aguiar-Oliveira & Maugeri, 2011) revelando que a ativação observada não se mantém sobre a enzima após outros tratamentos sendo possivelmente uma alteração momentânea na conformação da molécula. A pré-incubação e a liofilização combinadas também não revelaram nenhum resultado positivo para a enzima imobilizada e foram obtidos liofilizados com baixa atividade residual, resistência térmica e capacidade biocatalítica.

3.4- Efeito da liofilização da frutossiltransferase sobre a síntese otimizada de FOS

Com base em estudos anteriores (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2011) com a frutossiltransferase imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 imobilizada em nióbio, as condições otimizadas de síntese em frascos agitados foram definidas como: 48°C, 20 U_i/mL, 50% (p/p) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0; sob estas condições foi possível aumentar, aproximadamente, Y_{FOS} em 5% (0,58) e a produtividade específica de FOS em 26% (0,60 mg/U_i.h) além de reduzir o tempo de síntese de 96 h para 24 h. Assim sendo, avaliou-se a aplicação de um biocatalisador imobilizado e liofilizado em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5 em sínteses otimizadas de FOS em comparação com o biocatalisador não liofilizado. O resultado encontra-se expresso na Figura 2.

A conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}) representada na Figura 2.a demonstra que, sem a liofilização, Y_{FOS} é máximo em 24 h com 58% de conversão da sacarose em FOS e uma produtividade específica de 0,47 mg/U_i.h, entretanto, após a liofilização Y_{FOS} apresenta valores de 0,68-0,67 entre 48 e 72 h com produtividades específicas correspondentes a 0,35 e 0,23 mg/U_i^{Liof}.h. Desta forma, é possível afirmar que conversões

até 17% maiores são obtidas após a liofilização do imobilizado em tampão 4 vezes mais concentrado; mas a produtividade específica (Pr_{FOS}) é maior com a enzima imobilizada não liofilizada com valores variando entre 1,54 e 1,15 vezes maiores, apenas com 72 h de síntese Pr_{FOS} é 1,04 vezes maior com o imobilizado liofilizado. Portanto, após a liofilização, uma unidade de atividade enzimática imobilizada tem sua produtividade de FOS diminuída sob condições otimizadas de síntese.

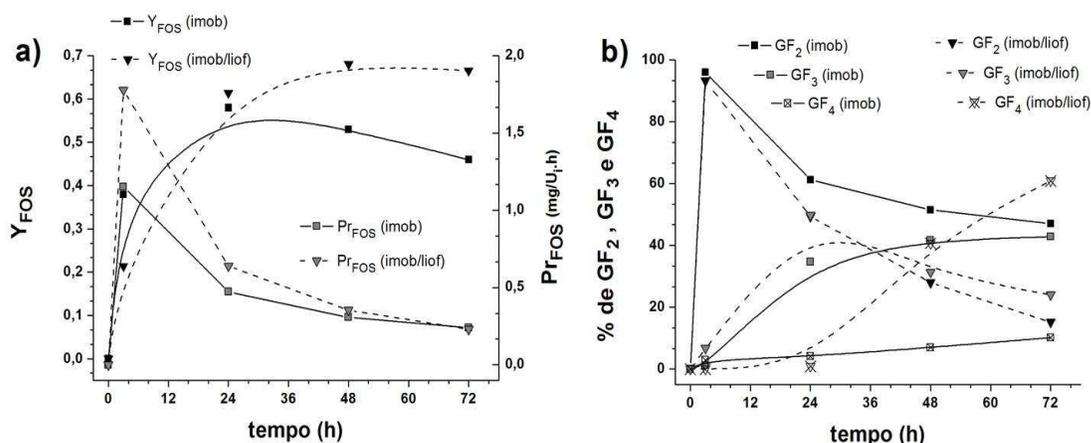


Figura 2: a) Conversão da sacarose em FOS (Y_{FOS}), produtividade específica de FOS (Pr_{FOS}) e b) composição percentual dos FOS obtidos com a frutossiltransferase (FTase) parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 nas formas não liofilizadas (quadrados e linhas cheias) e liofilizada (triângulos invertidos e linhas tracejadas) em tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5. As sínteses foram realizadas sob condições otimizadas: 48°C, 20 U_i/mL , 50% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 6,0.

Uma das maiores distinções, no entanto, é com relação à composição dos FOS produzidos com o tempo. De acordo com a Figura 2.b, após a liofilização observa-se uma redução mais acentuada na composição percentual de GF_2 chegando a 15% após 72 h e GF_3 e GF_4 atingem valores de 24 e 61% respectivamente neste mesmo tempo; em comparação com a síntese com o imobilizado não liofilizado a composição de GF_4 é um valor 76 vezes maior. Ainda não existe um consenso, mas estudos sugerem que quanto maior o grau de polimerização dos FOS melhores serão seus efeitos pré-bióticos (Stewart *et al.*, 2008) pois mais longo será o tempo de trânsito no intestino, enquanto que, outros estudos sugerem que o menor grau de polimerização ($n = 2$) é mais eficiente no aumento dos pró-bióticos (Suzuki *et al.*, 2006).

Würges *et al.* (2005) observaram que ao liofilizar Carlsberg subtilisina em *fumed silica* é possível obter um aumento de 130 vezes nos valores da eficiência catalítica (v_{\max}/K_m) e com KCl o aumento é de 1,5 vezes. Persson *et al.* (2002) obtiveram um aumento de 7 vezes no valor da atividade específica de uma lipase imobilizada em polipropileno macroporos Accurel[®] EP-100 e liofilizada em tampão fosfato em concentração mais elevada, 200 mM.

4- Conclusões

A liofilização da frutosiltransferase parcialmente purificada e imobilizada de *Rhodotorula* sp. LEB-V10 sem aditivos praticamente não alterou a atividade enzimática imobilizada, além de apresentar uma leve perda de aproximadamente 7% da atividade ao longo de 6 meses de estoque; alguns aditivos conseguiram isoladamente aumentar a atividade enzimática imobilizada após a liofilização e alguns deles até preservaram mais a atividade enzimática após 6 meses de estoque em comparação com a liofilização simples. Uma possível explicação seria o fato de que a frutosiltransferase é empregada parcialmente purificada e estas proteínas que não correspondem à enzima podem também auxiliar na proteção da molécula durante a liofilização e muitos autores defendem que a composição do meio de liofilização de uma proteína deve ser a mais simples possível, portanto, aditivos em excesso podem vir a comprometer a frutosiltransferase durante o processo de liofilização.

A grande maioria dos outros aditivos avaliados foi melhor para a enzima imobilizada liofilizada; com relação a estabilidade térmica, após a liofilização, destacou-se apenas o aditivo etileno glicol, mas a liofilização da enzima imobilizada em tampão acetato mais concentrado (100 e 200 mM) também resultou em boa estabilidade térmica. A produtividade específica de FOS foi aumentada em 1,3 e 1,4 vezes após a liofilização sem aditivos e com o sorbitol, respectivamente, em comparação com a condição não liofilizada.

A liofilização da enzima imobilizada em formulações, de forma geral, resultou em boa atividade enzimática residual porém, em menores valores de estabilidade térmica em comparação com o uso isolado dos aditivos. A produtividade específica de FOS foi aumentada com os formulados avaliados em até 17%, exceto pelo formulado contendo

CMC e trehalose, que resultou num valor 10% menor em comparação com a condição não liofilizada.

A liofilização da frutossiltransferase imobilizada em nióbio apresentou resultados interessantes, especialmente quanto a estabilidade após 6 meses de estoque e apresenta-se como uma metodologia aplicável para estoque e preservação da enzima imobilizada na forma pronta para uso biotecnológico. Foi possível obter altas composições de GF₄ em sínteses após a liofilização da enzima imobilizada, isto indica que a liofilização afeta de alguma forma a conformação da enzima e sua cinética, isto requer estudos específicos sobre a conformação proteica antes e após a liofilização.

5- Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

6- Nomenclatura

Aw	Atividade de água	U_i^{Liof}	Atividade enzimática imobilizada liofilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
CMC	Carboximetil celulose	U_i^o, U_i	Atividade enzimática imobilizada inicial ou não liofilizada ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
FOS	Fruto-oligossacarídeos	$U_i^{Liof, 65^\circ\text{C}}$	Atividade enzimática liofilizada após 15 min a 65°C
[FOS]	Concentração de FOS (g/L)	$^*U_{pn}^{Liof}$	Atividade enzimática específica liofilizada (U/mg)
FTase	Frutossiltransferase	Y_{FOS}	Conversão da sacarose em FOS
PEG	Poli(etileno glicol)		
R_{6m}^{Liof}	Atividade residual enzimática após 6 meses de estocagem		
R_o^{Liof}	Atividade residual liofilizada		
$R^{Liof, 65^\circ\text{C}}$	Atividade residual térmica liofilizada		

7- Referências Bibliográficas

- Aehle, W. (1990). **Enzymes in Industry: Production and Application**. 2nd Ed., Wiley-VCH, The Netherlands.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2011). **Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (3), 363-372.
- Aguiar-Oliveira, E. & Maugeri, F. (2010). **Characterization of Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** International Journal of Food Engineering, 6 (3), art. 9, DOI 10.2202/1556-3758.1894.
- Aguiar-Oliveira, E.; Rodrigues, M.I. & Maugeri, F. (2011). **Optimization of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase**. Current Chemical Biology, In the press.
- Alavarado-Huallanco, M.B. & Maugeri-Filho, F. (2010). **Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 85, 1654-1662, DOI 10.1002/jctb.2477.
- Blanch, H.W. & Clark, D.S. (1997). **Biochemical Engineering**. Marcel Dekker, Inc, New York.

- Cabral, E.C.M.; Zollner, R.L. & Santana, M.H.A. (2004). **Preparation and Characterization of Liposomes entrapping allergenic proteins**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 21 (2), 137-146.
- Cabral, J.M.S.; Best, D.; Boross, L. & Tramper, J. (1994). **Applied Biocatalysis**. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Cao, L. (2005). **Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design**. Wiley-VCH, The Netherlands.
- Carpenter, J.F.; Pikal, M.J.; Chang, B.S. & Randolph, T.W. (1997). **Rational Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Some Practical Advices**. Pharmaceutical Research, 14 (8), 969-975.
- Chaplin, M.F. & Bucke, C. (1990). **Enzyme Technology**. Cambridge University Press.
- Everse, J. & Stolzenbach, F.E. (1971). **Lyophilization**. Methods in Enzymology, 22, 33-39, DOI:10.1016/0076-6879(71)22007-3.
- Fágáin, C.Ó. (1997). **Stabilizing Protein Function**. Springer, Ireland.
- Gibson, T.D. & Woodward, J.R. (1993). **Enzyme stabilization**. US Patent: 5240843.
- Hernalsteens, S. & Maugeri, F. (2008). **Purification and characterization of a fructosyltransferase from Rhodotorula sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, 79, 589-596.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. Journal of Biology and Chemistry, 193, 265-275.
- Maiorano, A.E.; Piccoli, R.M.; Silva, E.S. & Rodrigues, M.F.A. (2008). **Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pré-biotics**. Biotechnology Letters, 30, 1867-1877, DOI 10.1007/s10529-008-9793-3.
- Maugeri, F. & Hernalsteens, S. (2007). **Screening of yeast strain for fructosylating activity**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 49 (1-6), 43-49.
- Oetjen, G.W. & Haseley, P. (2004). **Freeze-Drying**. Second, Completely Revised and Extended Edition, Wiley-VCH, Germany.
- Partridge, J.; Halling, P.J. & Moore, B.D. (1998). **Practical route to high activity enzyme preparation for synthesis in organic media**. Chemical Communications, 7, 841-842.
- Persson, M.; Wehtje, E. & Adlercreutz, P. (2002). **Factors Governing the Activity of Lyophilised and Immobilised Lipase Preparations in Organic Solvents**. ChemBioChem, 3, 566-571.
- Roser, B.J. (1990). **Protection of proteins and the like**. US Patent: 4891319.
- Ru, M.T.; Wu, K.C.; Lindsay, J.P.; Dordick, J.S.; Reimer, J.A. & Clark, D.S. (2001). **Towards More Active Biocatalysts in Organic Media: Increasing the Activity of Salt-Activated Enzymes**. Biotechnology and Bioengineering, 75 (2), 187-197.
- Sangeetha, P.T.; Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2005). **Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides**. Trends in Food Science & Technology, 16, 442-457.
- Sode, K. & Yasutake, N. (1997). **Preparation of lyophilized pyrroloquinoline quinine glucose dehydrogenase using trehalose as an additive**. Biotechnology Techniques, 11 (8), 577-580.
- Stewart, M.L.; Timm, D.A. & Slavin, J.L. (2008). **Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system**. Nutrition Research, 28, 329-334.
- Suzuki, N; Aiba, Y.; Takeda, H.; Fukumori, Y. & Koga, Y. (2006). **Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria**. Bioscience and Microflora, 25 (3), 109-116.
- Würges, K.; Pfromm, P.H.; Rezac, M.E. & Czermak, P. (2005). **Activation of subtilisin Carlsberg in hexane by lyophilization in the presence of fumed silica**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 34, 18-24.

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho permitem afirmar que a frutossiltransferase (FTase) extracelular de *Rhodorula* sp. LEB-V10 pode ser empregada em processos industriais para produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) com sucesso pois ela pode ser satisfatoriamente recuperada do meio de cultivo do microorganismo apenas por precipitação com etanol, resultando num concentrado proteico de alta capacidade de transfrutossilacção. Os resultados obtidos com a otimização da síntese de FOS empregando a enzima parcialmente purificada resultou numa conversão ($Y_{\text{FOS}} = 0,58$) semelhante à obtida por processos industriais convencionais que empregam enzimas intracelulares que requerem purificação (Capítulo 3), este é um fator de grande vantagem ao processo biotecnológico aqui apresentado. A liga de nióbio e grafite, empregada como suporte, é um composto inovador para imobilização enzimática – sendo o Brasil o maior produtor de nióbio do mundo – e a imobilização por adsorção é uma das técnicas de imobilização mais simples e de menor custo, mais uma vantagem adicional para emprego industrial da tecnologia. A adsorção conduzida em presença de sacarose em diferentes concentrações resultou em um biocatalisador sem alterações significativas em seu desempenho em sínteses de FOS (Capítulo 3). A presença do sal CuSO_4 durante a adsorção resultou num biocatalisador de menor eficiência de imobilização mas num desempenho em síntese 9-12% maior, mas quando o biocatalisador padrão é submetido à síntese de FOS em meio contendo este sal, os efeitos são drásticos (Capítulo 3), isto indica que por ser um sal promotor da estabilidade térmica (Capítulo 2) sua interação com a estrutura molecular da FTase indica alterar a conformação de tal forma a proteger os sítios ativos no interior da molécula reduzindo sua atividade enzimática observada e até mesmo inibindo a síntese de FOS. O nióbio e a FTase demonstraram interações de grande valor científico e industrial. O novo e distinto ponto de máxima atividade enzimática observado exclusivamente após a imobilização em pH 6,0 (Capítulo 2) revelou ser a condição de maior estabilidade térmica (Capítulo 4) e melhor condição para síntese de FOS (Capítulo 5). Acredita-se que devido a sua estrutura (hetero-dímero) a FTase possa interagir de forma única com o nióbio, que é um sólido-ácido, provocando alterações conformacionais após a imobilização, que favoreçam fenômenos como os acima mencionados; para uma melhor compreensão da forma como a enzima liga-se ao suporte, em qual subunidades localizam-se os sítios ativos e quais as alterações conformacionais provenientes da imobilização faz-se necessário estudos mais aprofundados e específicos quanto a estrutura molecular da enzima que forneceriam informações importantes e adicionais sobre a enzima. A relação de Arrhenius aplicada à estudos de termoestabilidade (Capítulo 4) mostrou que após a imobilização formou-se duas fases distintas com diferentes energias de ativação da desnaturação (E_{ad}) e especialmente com relação à temperatura entre 51 e 52°C ocorre algum tipo de limite energético ou conformacional adicional ao efeito do nióbio sobre a enzima, como este intervalo de temperatura é pequeno, é necessário também o estudo complementar deste interessante fenômeno observado cuja maior contribuição foi o favorecimento da estabilidade térmica expressa pela meia-vida ($t_{1/2}$) na faixa de temperaturas indicadas à síntese após a imobilização. A otimização da síntese de FOS empregando a enzima imobilizada (Capítulo 5) demonstrou que o aumento da concentração enzimática (U_i/mL)

no meio reativo é capaz de aumentar a velocidade de síntese, além de alterar as composições dos FOS obtidos, no entanto, é preciso respeitar o tempo ideal de síntese pois a partir dele o efeito começa a ser indesejável, pois, a velocidade de hidrólise torna-se muito maior que a de transfrutossilacção resultando num aumento da frutose residual no meio; estudos anteriores realizados sobre a cinética enzimática da FTase imobilizada em nióbio confirmam estas observações. O emprego do nióbio na imobilização de duas enzimas comerciais (inulinase e invertase) afetou a eficiência de imobilização destas enzimas com relação à atividade enzimática oferecida, sendo que, quase a totalidade da proteína oferecida foi adsorvida (Capítulo 6); isso indica que a imobilização suprime os sítios ativos destas enzimas de alguma forma, no entanto, seus perfis de substrato, pH e temperatura não apresentaram alterações significativas como as observadas com a FTase. Os estudos de liofilização da FTase livre (Capítulo 7) e imobilizada (Capítulo 8) foram motivados pela potencialidade de transposição desta tecnologia para escala industrial pois a liofilização permite o estoque e/ou distribuição do biocatalisador de forma a preservar sua atividade biocatalítica, já que em solução ou congelados observa-se uma grande perda de atividade ao longo do tempo. A liofilização, apesar de uma técnica de alto custo, mostrou ser viável para a FTase e apresentou resultados interessantes, especialmente com relação à alteração na cinética enzimática em sínteses de FOS sob condições definidas como otimizadas no Capítulo 5; com a FTase livre e imobilizada observou-se após a liofilização um aumento na velocidade de conversão da sacarose em FOS e especialmente no aumento significativo da composição de GF₄, especialmente com a enzima imobilizada. A liofilização causa alterações conformacionais nas moléculas, no entanto, estas podem ser perceptíveis ou não, e para a FTase ficou claro que a liofilização favoreceu a cinética de produção dos FOS no entanto, o mecanismo envolvido nesta alteração ainda é desconhecido. Muitos pesquisadores defendem que quanto maior a cadeia do FOS consumido, maiores serão os benefícios ao organismo pois, maior será o tempo de trânsito no intestino. Por se empregar uma solução enzimática parcialmente purificada é possível concluir que, os efeitos da adição individual de compostos crio-protetores à liofilização foram melhores do que sob formulações, devido à presença de outras proteínas precipitadas juntamente com a FTase que conferem uma proteção extra durante a liofilização e o excesso de componentes na liofilização pode ser prejudicial ao biocatalisador em questão. A liofilização da FTase livre resultou em perda de atividade a depender da diluição empregada na solução de partida, mas com relação à atividade por peso observou-se um aumento de até 6 vezes no valor; com a FTase imobilizada houve um certo grau de manutenção da atividade enzimática após a liofilização demonstrando que a liofilização da enzima já imobilizada é uma técnica interessante pois permitiria o estoque do biocatalisador já pronto para uso. Em conclusão, com relação aos processos industriais comerciais para obtenção de FOS por via química ou enzimática, o emprego da FTase imobilizada apresenta viabilidade e certas vantagens, especialmente com relação aos custos envolvidos no processo e a facilidade de reprodução da técnica, portanto, estudos de aplicação deste biocatalisador em reatores é imprescindível.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Estudos conformacionais da FTase livre e imobilizada entre as temperaturas de 51 e 52°C.
- Estudos conformacionais da FTase livre e imobilizada após liofilização e como isto afeta a cinética enzimática.
- Aplicação da FTase imobilizada em reatores do tipo: coluna, com cesto fixo do tipo batelada e contínuo (em progresso).
- Teste com outras metodologias ou etapas complementares à metodologia de adsorção que aumentem a estabilidade e aplicabilidade do biocatalisador em reatores (em progresso).
- Modelagem matemática da FTase imobilizada em reatores batelada e contínuo com cesto fixo (em progresso).