

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

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE
FRUTOSILTRANSFERASE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES
BIOQUÍMICAS DA FRUTOSILTRANSFERASE DE *Penicillium* sp.**

Júnio Cota Silva
Biólogo

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
Orientadora

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

CAMPINAS
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38i Silva, Júnio Cota
Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium* sp. / Júnio Cota Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Seleção microrganismos. 2. Frutooligossacarídeos. 3. Frutossiltransferase. 4. Caracterização bioquímica. 5. *Penicillium* sp.
I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Screening of microrganisms for transfructosylating activity and study of biochemical properties of fructosyltransferase from *Penicillium* sp.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Screening, Frutooligosaccharides, Fructosyltransferase, Biochemical characterization, *Penicillium* sp.

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Mário Roberto Maróstica Júnior

Luciana Francisco Fleuri

Data de defesa: 20/02/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida e aprovada em de de 2009, pela
banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore – Orientadora
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Universidade Metodista de Piracicaba

Profa. Dra. Saartje Hernalsteens
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Universidade Estadual de Campinas

**“Ter Fé é acreditar nas coisas que você não vê; a recompensa por essa
Fé é ver aquilo em que você acredita.”
Agostinho de Hipona - Teólogo e Filósofo Cristão (354-430)**

DEDICO

Aos meus pais Geraldo e Helena pelo grande amor e apoio incondicionais ao longo dessa caminhada. Aos meus irmãos Renato e Viviane pelo amor e companheirismo. À Valéria, meu grande amor, pelo carinho, incentivo e por me inspirar a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me dar vida, saúde e força para enfrentar os desafios da vida e porque, sem Ele, não teria chegado até aqui.

À Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore pela orientação, incentivo e por acreditar em mim.

À Profa. Dra. Saartje Hernalsteens pelo auxílio, sugestões e paciência na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pelas sugestões e por ter aberto as portas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos para a realização das análises.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica e à Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri por todo o auxílio e sugestões.

Aos amigos do laboratório de Bioaromas, especialmente Bichão, Xispita, Biscatê, Angel e Molinão pela amizade verdadeira e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, especialmente à Zama pela amizade e por me socorrer muitas vezes no desenrolar desse trabalho, e também ao Geraldo e à Raquel pelo auxílio na execução das análises, e à Ana pela companhia nos finais de semana.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, especialmente ao grande amigo Fabi (Xispita, 2008), mais conhecido como John Square.

Aos amigos da BIO UFV 2003 pelo companheirismo, especialmente ao Rômulo, grande amigo desde os tempos remotos de Viçosa.

Ao companheiro de república Papito Tchureba pelos bons momentos e pelo companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório de Bioaromas Nadir e Dora pela amizade e pela força ao longo desses dois anos.

À Universidade Federal de Viçosa pela formação ao longo de quatro anos.

À Universidade Estadual de Campinas por tornar esse sonho possível.

À CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Frutooligossacarídeos.....	3
2.2. Ingestão de FOS e benefícios à saúde.....	5
2.3. Produção biotecnológica de FOS por enzimas microbianas.....	6
2.4. Aplicações dos FOS	9
2.5. O mercado de FOS.....	10
2.6. Novas tendências na produção de FOS: melhoramento genético da frutossiltransferase e uso de substratos de baixo valor agregado.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Isolamento de microrganismos do Baru.....	15
3.2. Pré-seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase	15
3.2.1. Desenvolvimento do inóculo	15
3.2.2. Produção da enzima frutossiltransferase	16
3.2.3. Determinação da atividade de frutossiltransferase	16
3.3. Seleção de microrganismos produtores de FOS	17
3.3.1. Produção de FOS por via enzimática.....	17
3.3.2. Análise quantitativa da produção de FOS	17
3.4. Caracterização bioquímica da frutossiltransferase	18
3.4.1. Efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática.....	18
3.4.2. Efeito da temperatura na meia vida enzimática	18
3.4.3. Efeito do substrato na cinética reacional.....	20
3.4.4. Efeito de diferentes formulações de tampões na atividade enzimática	21
3.5. Identificação do gênero da linhagem produtora de frutossiltransferase	22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Isolamento de microrganismos do Baru.....	23
4.2. Pré-seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase	23
4.3. Seleção de microrganismos produtores de FOS	25
4.4. Estudo das características bioquímicas da FTase de <i>Penicillium</i> sp.....	29
4.4.1. Identificação do gênero do microrganismo selecionado.....	29
4.4.2. Efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática da frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp.....	29
4.4.3. Efeito da temperatura na meia vida enzimática ($t_{1/2}$).....	35
4.4.4. Efeito do substrato na cinética reacional.....	40
4.4.5. Efeito de diferentes formulações de tampões na atividade enzimática	43
4.4.6. Cinética reacional da síntese de FOS pela frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp.	43
5. CONCLUSÕES	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da produção de FOS por FTase de várias fontes microbianas.....	9
Tabela 2: Fatores e seus respectivos níveis estudados no delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ³ para atividade enzimática	18
Tabela 3: Linhagens microbianas isoladas do Baru e seus locais de origem	23
Tabela 4: Comparação entre as atividades enzimáticas das preparações enzimáticas parcialmente purificadas das diferentes linhagens estudadas	24
Tabela 5: Estudo da reação de síntese de FOS pelas 13 linhagens pré-selecionadas..	28
Tabela 6: Configuração dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 ³ para atividade enzimática.....	30
Tabela 7: Coeficientes de regressão para a resposta atividade enzimática da FTase de <i>Penicillium</i> sp. obtidos pelo erro residual	31
Tabela 8: Análise de variância no estudo do efeito do pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática da FTase de <i>Penicillium</i> sp.	32
Tabela 9: Perfil de k_d , da meia vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal (D) da FTase de <i>Penicillium</i> sp. em diferentes temperaturas.....	36
Tabela 10: Valor médio da força de transfrutossilacção (U_{TF}/U_H)*100 da enzima FTase de <i>Penicillium</i> sp. em diferentes tempos e diferentes temperaturas	39
Tabela 11: Valores médios atividade enzimática (U_{TF}) em função da concentração de sacarose.....	42
Tabela 12: Análise de significância entre as médias das atividades em cada tampão avaliado.....	43
Tabela 13: Perfil dos açúcares consumidos e/ou produzidos pela reação de síntese de FOS pela frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular dos frutooligossacarídeos e neofrutooligossacarídeos: (a) 1-kestose, (b) 1-nistose, (c) neo-kestose e (d) neo-nistose	4
Figura 2: Fotomicrografia óptica de conídios de <i>Penicillium</i> sp. observados com aumentos de 200 e 400 vezes respectivamente	29
Figura 3: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp. em função da temperatura e do pH	33
Figura 4: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp. em função da concentração de substrato e do pH	34
Figura 5: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp. em função da concentração de substrato e da temperatura.....	34
Figura 6: Valores observados <i>versus</i> valores previstos da atividade de frutossiltransferase de <i>Penicillium</i> sp.....	35
Figura 7: Efeito da temperatura sobre a meia vida da enzima FTase de <i>Penicillium</i> sp.	36
Figura 8: Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para cálculo de E_{ad} para a FTase de <i>Penicillium</i> sp.	37
Figura 9: Linearização da redução decimal para cálculo do valor z para a FTase de <i>Penicillium</i> sp.	38
Figura 10: Comportamento da atividade de frutossiltransferase da FTase de <i>Penicillium</i> sp. ao longo do tempo de acompanhamento nas quatro temperaturas estudadas.....	39
Figura 11: Efeito da concentração de substrato sobre a cinética reacional da enzima FTase de <i>Penicillium</i> sp.	42
Figura 12: Cinética reacional da síntese de FOS pela FTase de <i>Penicillium</i> sp.	45
Figura 13: Cromatograma da reação de síntese de FOS pela FTase de <i>Penicillium</i> sp no tempo 48 horas	46

RESUMO

Impulsionados pela grande demanda por alimentos “saudáveis” e de calorias controladas, têm surgido desde os anos 80 um grande número de adoçantes alternativos e, entre eles, diversos oligossacarídeos. Entre os oligossacarídeos mais estudados estão os frutooligossacarídeos (FOS), que se tornaram mais importantes por suas propriedades funcionais que pelo seu poder adoçante. Os FOS podem ser produzidos por meio da reação de transfrutossilacção catalisada pela enzima frutossiltransferase (FTase), onde uma molécula de sacarose é hidrolisada e o radical frutossil é transferido para outra sacarose. Diversos microrganismos possuem o gene que codifica para a FTase, e sua aplicação industrial já está bem estabelecida, contudo, o Brasil detém apenas uma pequena fração do total de patentes desses processos tecnológicos. Esse trabalho teve por objetivo selecionar novas linhagens microbianas produtoras de frutossiltransferase que sejam eficientes e competitivas com as já descritas na literatura. Para isso, novas linhagens de microrganismos foram isoladas do Baru, um fruto do cerrado. Inicialmente 54 linhagens foram avaliadas quanto à atividade de transfrutossilacção, sendo identificadas 13 como potenciais produtoras de FTase. Cada uma das 13 linhagens foi testada com relação à síntese de FOS em diferentes tempos de reação (6, 12, 24, 48 e 72 h), tendo sido utilizadas preparações enzimáticas parcialmente purificadas. A FTase de *Penicillium* sp. apresentou o maior rendimento da reação de síntese de FOS (50%), sendo as condições de reação 500g.L⁻¹ de sacarose, 20% de enzima (v/v), agitação de 100 rpm, temperatura de 50°C e tempo de reação de 48 horas, em tampão acetato 50 mM (pH 4,5). Baseando-se no rendimento da reação de síntese de FOS, essa linhagem de *Penicillium* sp. foi selecionada para realização de estudos dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da FTase. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para avaliar as condições ótimas de atividade enzimática, sendo estas: pH de 4,8 a 5,2, 54 a 57°C e sacarose (410 a 520 g.L⁻¹). Os parâmetros termodinâmicos tempo de meia vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação (k_d) e valor de redução decimal (D) foram determinados para cada uma das quatro temperaturas estudadas (45, 50, 55 e 60°C). A energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) e o valor z também foram calculados para a FTase. A enzima estudada

apresentou inibição pelo substrato quando a concentração de sacarose foi superior a 400 g/L. Os parâmetros cinéticos v_{max} , k_m e k_i foram estimados pelos métodos de linearização de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofsteen e pelo modelo de clássico de inibição combinado com o modelo de Hill utilizando o software Statistica[®] 8.0. A análise das constantes sugere que há um fenômeno de inibição que afeta a enzima e não foi possível a identificação de quais componentes do sistema reacional causam a inibição enzimática, utilizando apenas o modelo clássico de inibição, sendo necessários estudos futuros para desenvolver o modelo cinético adequado para a FTase. Os resultados obtidos indicam que a FTase de *Penicillium* sp. tem potencial para ser aplicada em processos industriais para produção de FOS.

ABSTRACT

Nowadays, there is a high demand on health and low caloric food. Since the years of 1980 a big number of sweeteners have appeared to replace sucrose. The fructooligosacchrides (FOS) are considered the most important sweeteners among them due their properties to promoting health by increasing of the amount of beneficial bacteria in human gut. They can be produced by simple transfructosilation reaction catalysed by fructosyltransferase (FTase), wherein one molecule of sucrose is hydrolyzed and the fructosyl radical is bonded to another sucrose. Some microorganisms have the gene encoding FTase and its industrial applications are well known. However, Brazil has a small share of patents registered around the world in these technological process. In this work, we aimed to find potential microorganisms strains that produce both FTase and FOS. New strains were isolated from Baru fruits of Brazilian Cerrado biome. Initially 54 isolated strains were screened for transfructosilating activity. As result it was found 13 strains which were able to produce FTase. Enzimatic extracts partially purified from each of 13 strains were evaluated in the ability to produce FOS in several reaction times (6, 12, 24, 48 and 72 h). The reaction conditions were 500 g.L⁻¹ sucrose, 20% (v/v) enzyme:solution, 100 rpm, 50°C and 48 h reaction time in acetate buffer 50 mM (pH 4,5). The *Penicillium* sp. FTase showed the highest yield of FOS synthesis. Hence this strain was selected to study the FTase kinetical and thermodynamical properties. The best conditions found using the Response Surface Methodology were: pH 4.8 to 5.2; 54 to 57°C and 410 to 520 g.L⁻¹ sucrose. The thermodynamic parameters half-life ($t_{1/2}$), denaturation constant (k_d) and the decimal reduction time (D) were calculated to each of the four tested temperatures (45, 50, 55 e 60°C). The activation energy of denaturation (E_{ad}) and the z-value were also calculated. This enzyme showed inhibition by substrate when the sucrose concentration was above 400 g.L⁻¹. The kinetical parameters v_{max} , k_m e k_i were estimated by Lineweaver-Burk e Eadie-Hofsteen linearization methods. In addition, these constants were also estimated by classic model of inhibition combined with the Hill model using the StatisticaTM 8.0 software. The data analisys indicated an enzymatic inhibition fenomena. However, it was not possible to identify which agents triggered the enzymatic inhibition using only the

classic model. It is necessary more future studies to elucidate the appropriated model to FTase. These results suggest that the FTase from *Penicillium* sp. has a great potential to be applied in further FOS industrial processes.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (OMS), ao final da década de 90, definiu o termo saúde como sendo o estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não meramente a ausência de doença ou enfermidade. Paradoxalmente, a sociedade moderna tem adquirido hábitos de vida que levam à debilitação da saúde humana e, conseqüentemente, tem apresentado uma maior frequência de sintomas como cansaço, depressão, irritação e estresse (Kwak & Jukes, 2001). Nesse contexto houve uma mudança no conceito da dieta, que passou a ser vista como uma potente ferramenta para prevenir doenças e proporcionar bem estar. Assim, houve um aumento da procura por alimentos funcionais que, além do fator nutricional, proporcionam benefícios à saúde. Um alimento funcional deve ser um alimento e deve demonstrar seus efeitos em quantidades que normalmente se espera consumir em uma dieta, não podendo ser pílula ou cápsula, mas deve ser parte do padrão de alimentos normais (Diplock et al., 1999; Sangeetha et al., 2005b).

Dentre os diversos componentes bioativos encontrados em um alimento funcional, destacam-se os probióticos e os prebióticos. Os probióticos são suplementos alimentares de microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas na dieta, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO-WHO, 2001; Sanders, 2003). Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä et al., 2002). Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente e melhoram a saúde do hospedeiro, por estimularem seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias intestinais benéficas, como as dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, em detrimento de bactérias patogênicas, como as do gênero *Clostridium* (Gibson & Roberfroid, 1995; Chockchaisawasdee et al., 2005). Dentre os compostos prebióticos mais estudados, pode-se ressaltar os oligossacarídeos, ou NDO (sigla em inglês para *non digestible oligosaccharides*). Os NDO são encontrados naturalmente em diversos alimentos,

incluindo frutas, verduras, leite e mel. Entretanto, há ainda uma variedade de oligossacarídeos de origem microbiana, isto é, aqueles obtidos através da ação de enzimas microbianas específicas. Estruturalmente, oligossacarídeos são compostos de 2 a 10 resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que podem ser prontamente hidrolisadas por ácidos ou enzimas específicas. Além de regular a microbiota intestinal, afetam outras funções fisiológicas, como aumento na absorção de minerais, efeito anticariogênico e redução dos níveis de colesterol no plasma e de glicose no sangue (Nakakuki, 2002).

Os frutooligossacarídeos (FOS) são, atualmente, um dos mais importantes NDO produzidos pela indústria de ingredientes alimentares. A maior parte da produção mundial é feita por via biotecnológica, por meio de reações de transfrutossilacção enzimática. Os FOS são amplamente utilizados em alimentos funcionais devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas (Yun, 1996). O Brasil possui poucas patentes relacionadas à produção de FOS se comparado aos principais países produtores. Entretanto, para tornar-se competitivo no mercado internacional, é interessante que o país eleve o nível tecnológico de processos biotecnológicos industriais, de forma a não depender de tecnologias estrangeiras para produzir esses açúcares. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de trabalhos que busquem novas fontes microbianas de frutossiltransferase, capazes de produzir FOS de maneira eficiente e competitiva.

Os microrganismos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica (Souza et al., 2004). Colonizam os tecidos saudáveis de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhe causar danos aparentes (Petrini, 1991). Devido aos meios sutis usados para a colonização dos tecidos das plantas, um ambiente inicialmente hostil, os microrganismos endofíticos desenvolvem um sistema enzimático muito eficiente para adquirir os nutrientes de que precisa para sua sobrevivência. Atualmente pouco se conhece a respeito dos microrganismos endofíticos, em especial aqueles presentes no bioma cerrado. Assim, o isolamento de microrganismos endofíticos de frutos do cerrado pode ser uma boa estratégia na busca por novas linhagens produtoras de frutossiltransferase.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são oligômeros de frutose, representados principalmente por 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄). As unidades de frutossil (F) são unidas entre si e à sacarose por ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow1)$, o que os distingue de outros oligômeros (Yun, 1996). Os FOS são oligossacarídeos de ocorrência natural e, principalmente, de origem vegetal, tendo já sido relatados em um grande número de espécies vegetais (Hartemink et al., 1997). Entretanto, os frutooligossacarídeos também podem ser obtidos por meio da ação de enzimas microbianas. Atualmente, os FOS de origem microbiana têm atraído uma atenção especial, sendo atribuída a eles a expansão do mercado de açúcares funcionais. Isto se deve ao fato de sua produção em massa não ser complicada e seu sabor doce, embora de menor intensidade, ser muito similar ao da sacarose, um adoçante tradicional (Yun, 1996). Embora os FOS não sejam metabolizados pelo organismo humano a maioria das bifidobactérias é capaz de fermentá-los (Molis et al., 1996). Assim, não são considerados fonte de energia e podem ser utilizados de modo seguro como adoçantes alternativos em formulações para diabéticos (Hartemink et al., 1997).

Os frutooligossacarídeos apresentam características que permitem sua aplicação em diversos tipos de alimentos. Eles possuem cerca de 30% do poder adoçante da sacarose, não precipitam, não deixam sensação de secura ou areia na boca, são altamente higroscópicos, não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento e a viscosidade da solução de FOS é relativamente maior que a da solução de sacarose de mesma concentração. Entretanto, podem ser hidrolisados em frutose em condições muito ácidas ou quando submetidas à exposição prolongada de determinados binômios tempo/temperatura (Yun, 1996; Bornet, 1994). Os oligossacarídeos também podem ser usados para alterar a temperatura de congelamento dos alimentos e controlar o nível de escurecimento devido à reação de Maillard em alimentos processados com o uso do calor. Além disso, promovem retenção da umidade, prevenindo a excessiva secagem e proporcionando uma baixa

atividade de água, que é conveniente no controle de contaminação microbiana (Crittenden e Playne, 1996).

Atualmente tem sido reportada uma nova classe de FOS, os neofruooligosacarídeos (neo-FOS) (Hayashi et al., 2000, Lim et al., 2007). Eles se distinguem quimicamente dos FOS comuns por apresentarem uma estrutura ramificada e os resíduos de frutossil unidos à sacarose por ligações glicosídicas do tipo $\beta(2\rightarrow6)$, diferentemente da ligação $\beta(2\rightarrow1)$. Uma solução contendo neo-FOS a 60% possui viscosidade semelhante a uma solução de FOS a mesma concentração, além de possuir semelhante estabilidade ao pH, entretanto, são mais estáveis termicamente que os FOS convencionais (Lim et al., 2007).

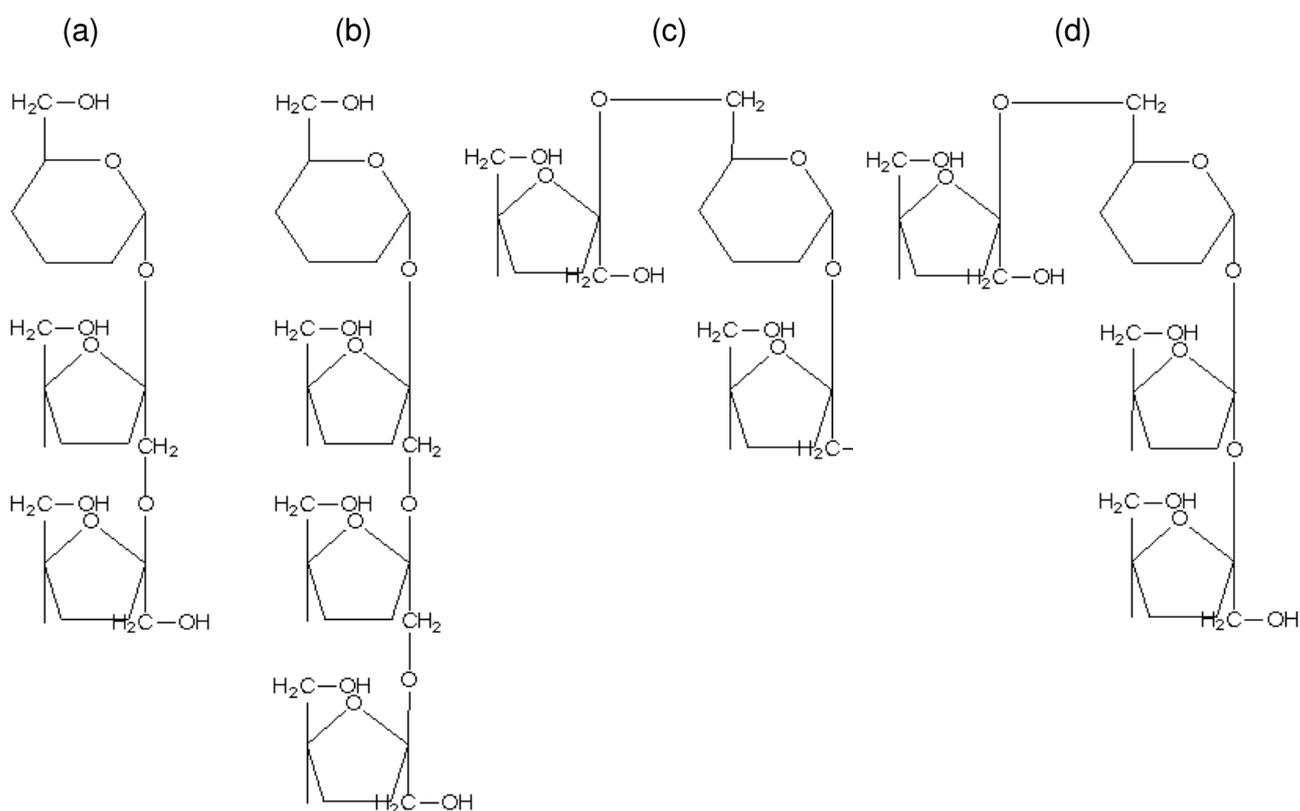


Figura 1: Estrutura molecular dos frutooligosacarídeos e neofruooligosacarídeos: (a) 1-kestose, (b) 1-nistose, (c) neo-kestose e (d) neo-nistose

2.2. Ingestão de FOS e benefícios à saúde

A ingestão diária de FOS pode resultar em um aumento seletivo de bifidobactérias no trato intestinal, como já demonstrado em diversos experimentos (Yamashita et al., 1984; Modler, 1994; Bouhnik et al., 1996; Hartemink et al., 1997; Sakai et al., 2001). Foi verificado em um estudo com ratos um aumento significativo na quantidade de *Lactobacillus* em relação às outras bactérias presentes no trato gastrointestinal e diminuição de Bacteroidaceae, quando estes foram submetidos a uma dieta de frutooligossacarídeos de cadeia curta (Sakai et al., 2001). Bactérias patogênicas incluindo *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* também foram inibidas pelo uso de FOS (Gibson & Roberfroid, 1995; Yamashita et al., 1984; Wang & Gibson, 1993; Spiegel et al., 1994), provavelmente devido à queda do pH intestinal, causada pelo aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta ou SCFA (sigla em inglês para *Short Chain Fatty Acids*) (Yamamoto et. al., 1999). Outro estudo, realizado com 20 voluntários, revelou que a ingestão de FOS em doses diárias de 12,5 g (durante três períodos consecutivos de 12 dias) levou a um aumento significativo na contagem de bifidobactérias fecais e na atividade de beta-frutosidase (inulinase) (Bouhnik et al., 1996).

Ensaio laboratoriais demonstraram que a ingestão desses açúcares aumentou consideravelmente a absorção de minerais como cálcio, magnésio e fósforo. Houve ainda redução de inflamação decorrente da deficiência de magnésio (Ohta et al., 1993, 1994, 1995a, 1995b). A suplementação da dieta de ratos com 1, 2 e 5% de FOS diminuiu o pH intestinal (quanto maior foi a concentração de FOS menor foi o pH) e aumentou linearmente a absorção de magnésio. Os macrominerais (Ca, P, Mg, Na, Cl e K) ficaram com balanço positivo para os três tratamentos (Wolf et al., 1998). Ahrens & Schrezenmeir (2002) reportaram que para uma dieta contendo 0,5% de cálcio é necessário 10% de oligofrutose para se obter aumento significativo na mineralização óssea.

Devido ao equilíbrio gerado na microbiota gastrointestinal, outras respostas podem ser estimuladas pela ingestão de FOS, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, normalizando a pressão sanguínea e lipídeos

séricos, além de melhorar o metabolismo de indivíduos com diabetes (Yamashita et al., 1984; Spiegel et al., 1994; Kaufhold et al., 2000). Pode ser observado ainda um aumento da digestão e metabolismo da lactose; aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno; aumento da síntese de vitaminas, principalmente do grupo B; aumento da produção de compostos imunoestimulantes e com atividade antitumoral; diminuição do crescimento de bactérias nocivas; diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio na restauração da microbiota intestinal durante terapia com antibióticos. Também se atribui ao consumo de FOS a redução da potencialidade de várias patologias humanas normalmente associadas com o alto número de bactérias intestinais patogênicas, como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (Yun, 1996; Delzenne et al., 2002; Pool-Zobel et al., 2002).

2.3. Produção biotecnológica de FOS por enzimas microbianas

Os FOS podem ser obtidos por meio de dois processos distintos. Primeiramente, podem ser produzidos por hidrólise enzimática de inulina, consistindo de unidades lineares de frutose com ou sem uma unidade final de glicose. Nestes compostos, o grau de polimerização pode variar entre 1 e 7 unidades de frutose. A inulina e os FOS estão amplamente distribuídos na natureza, sendo esses sacarídeos encontrados em mais de 36 mil espécies de plantas (Roberfroid et al., 1993).

A produção também pode ocorrer por via biotecnológica, por meio da ação de enzimas microbianas, consistindo tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutose (Hartemink et al., 1997). Os FOS de origem microbiana são produzidos por transfrutoseilação enzimática, a partir da sacarose, sendo essa reação catalisada pelas enzimas β -frutofuranosidase ou frutoseiltransferase. Na literatura observa-se uma divergência entre os autores quanto à denominação da enzima. Alguns se referem às enzimas como frutofuranosidases (E.C.3.2.1.26) e outros como frutoseiltransferases (E.C.2.4.1.9), ainda que oriundas do mesmo microrganismo, como *Aspergillus niger*.

Isso se deve ao fato de que alguns autores utilizam a denominação de frutossiltransferase para diferenciá-la das enzimas hidrolíticas, enquanto outros consideram a atividade de transfrutossilacção como uma reacção que ocorre na utilização de invertase em altas concentrações de sacarose (Yun, 1996). Contudo, os dois tipos de enzimas microbianas, as hidrolases (glicosidases, EC 3.2.) e as transferases (glicosil-transferase, EC 2.4.), podem, em teoria, sintetizar oligossacarídeos (Monsan & Paul, 1995).

Várias enzimas com atividade de transfrutossilacção foram identificadas e caracterizadas em diversos microrganismos, como *Glucanocetobacter diazotrophicus* (Hernandez et al., 1995; Martínez-Fleites et al., 2005), *Lactobacillus reuteri* (van Hijum et al., 2004; Ozimek et al., 2006), *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Hettwer et al., 1995), *Streptococcus salivarius* (Song & Jacques, 1999), *Bacillus subtilis* (Chambert et al., 1974; Chambert & Gonzy-Tréboul, 1976), *Klyveromyces marxianus* (Santos & Maugeri, 2007), *Aspergillus aculeatus* (Ghazi et al., 2006), *Aspergillus niger* (Park & Almeida, 1991), *Aspergillus oryzae* (Sangeetha et al., 2005a), *Aspergillus japonicus* (Dorta et al., 2006), *Penicillium citrinum* (Hayashi et al., 2000, Lim et al., 2007). A tabela 1 resume as características da produção de FOS por enzimas de diversas fontes microbianas.

Park et al. (2005) produziram neo-FOS por processo contínuo em reator do tipo leito fixo (ou leito empacotado) com capacidade para 500 mL, utilizando células intactas imobilizadas de *Penicillium citrinum* KCCM 11663, sob condições ótimas de 50°C, pH 6, sacarose a 600 g.L⁻¹ e um fluxo de alimentação de substrato de 1,3 mL.min⁻¹. A produção nesse sistema foi de 49 g.L⁻¹, sendo descrita uma produção contínua durante 50 dias. Han et al. (2007) desenvolveram dois sistemas de produção simultânea de FOS e neo-FOS, utilizando *Penicillium citrinum*. O primeiro sistema utilizou micélio de *P. citrinum* em fermentação descontínua, sem ajuste de pH, a 45°C, 24 h e sacarose a 65-70 °Brix. A produção de ambos oligossacarídeos por esse sistema foi de 65% (p/p). O segundo sistema constava de células de *P. citrinum* imobilizadas em alginato de sódio, para ser utilizado em cultura contínua. As esferas de alginato de sódio foram utilizadas para empacotar uma coluna, por onde flui, com o auxílio de uma bomba peristáltica, uma solução de sacarose de 60° Brix. O sistema funcionou durante

40 dias, a uma temperatura de 45°C, resultando numa produção de FOS e neo-FOS de 55-60% (p/p), não havendo alteração das esferas de alginato ao final do processo.

Um dos fatores limitantes para a produção de FOS é a concentração de glicose, subproduto gerado pela reação de transfrutossilacção (Duan et al.,1994), sugerindo que há uma regulação alostérica da enzima frutossiltransferase pela glicose do tipo feedback negativo ou inibição pelo produto. A atividade de transfrutossilacção não diminui no decorrer da reação se a glicose for removida do meio, produzindo assim elevadas concentrações de FOS. Yun & Song (1993) desenvolveram um sistema misto com duas enzimas para produção de FOS, utilizando simultaneamente frutossiltransferase de *Aureobasidium pullulans* e glicose oxidase de *Aspergillus niger* a 10 U.g⁻¹ de sacarose. A reação se processou em um reator sob agitação durante 25 h, a 40°C, sacarose a 40% (p/v) e pH 5,5. Ao final do processo foi obtido mais de 90% (p/p) de FOS com esse sistema misto. A glicose produzida durante a reação foi transformada em ácido glicurônico pela ação da enzima glicose oxidase, que pode ser rapidamente separado dos açúcares neutros por uma simples cromatografia de troca iônica. De modo análogo, Sheu et al. (2001) alcançaram aproximadamente 93% (p/p) de FOS utilizando um sistema misto de enzimas com β-frutofuranosidase (*Aspergillus japonicus*) e glicose oxidase (20 U.g⁻¹ de sacarose) comercial (Gluzyme, Novo Nordisk). A reação foi mantida em um reator sob agitação (300 rpm) e aeração (5 L.min⁻¹), a 37°C e pH 5,5, com teor de sacarose de 30% (p/v). Após o término da reação, apenas 2,4 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de sacarose permaneceram no sistema e, o ácido glicurônico produzido pela ação da enzima glicose oxidase foi separado do sistema por precipitação com íons de cálcio, formando o gluconato de cálcio.

Tabela 1: Características da produção de FOS por FTase de várias fontes microbianas

Microrganismo	Enzima / Forma de uso	Condições ótimas	Y _{FOS} *	Referência
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Levansucrase (E.C. 2.4.1.10) – Enzima livre	40°C - pH 5,5 - 18 h - 200 rpm - sacarose 60%	Y _{FOS} : 50%	Támbara et al. (1999)
<i>Bacillus macerans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.4.1.9) – Enzima livre	50°C - pH 7,0 - 100 h - sacarose 50%	Y _{FOS} : 43%	Kim et al. (2000)
<i>Kluyveromyces marcianus</i>	Inulinase – Enzima Imobilizada	50°C - pH 6,0 - 4 h - sacarose 45%	Y _{FOS} : 10%	Santos & Maugeri (2007)
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-frutossiltransferase – Micélio livre	50°C - 40 h - 100 rpm - sacarose 70%	Y _{FOS} : 57%	Hayashi et al. (2000)
<i>Penicillium citrinum</i>	Neo-frutossiltransferase – Micélio e enzima co-imobilizados	50°C - pH 6,0 - 48 h - 100 rpm - sacarose 60%	Y _{FOS} : 18%	Lim et al. (2007)
<i>Aspergillus sp.</i>	β-frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	40°C - pH 5,5 - 6 h - sacarose 61,5%	Y _{FOS} : 61%	Fernández et al. (2004)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	40°C - pH 5,5 - 25 h - 500 rpm - sacarose 40%	Y _{FOS} : 91%	Yun & Song (1993)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	55°C - pH 5,5 - 24 h - sacarose 80%	Y _{FOS} : 56%	Sangeetha et al. (2004a)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Frutossiltransferase (E.C. 2.1.4.9.) – Enzima livre	55°C - pH 5,5 - 12 h - sacarose 55%	Y _{FOS} : 54%	Sangeetha et al. (2004b)
<i>Aspergillus niger</i>	β-frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	40-65°C - pH 6,0-8,5 - sacarose 40-70%	Y _{FOS} : 60%	Park & Pastore (2006)
<i>Aspergillus japonicus</i>	β-frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Micélio imobilizado	55°C - pH 5,5 - 4 h - sacarose 65%	Y _{FOS} : 61%	Cruz et al. (1998)
<i>Aspergillus japonicus</i>	β-frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) – Enzima livre	37°C - pH 5,5 - 8,5 h - 200 rpm - sacarose 30%	Y _{FOS} : 93%	Sheu et al. (1998)

* Rendimento de FOS (Y_{FOS}) é dado pela concentração final de FOS (g.L⁻¹) dividida pela concentração inicial de sacarose (g.L⁻¹) (x 100)

2.4. Aplicações dos FOS

Devido às suas propriedades funcionais e de baixo valor calórico, aproximadamente 1 kcal.g^{-1} (Roberfroid et al., 1993), os FOS podem ser usados em formulações de sorvetes e sobremesas lácteas rotuladas como “açúcar reduzido”, “sem adição de açúcar”, “calorias reduzidas” ou “produto sem açúcar”; em formulações para diabéticos; em alimentos funcionais que promovam efeito nutricional adicional de prebióticos, simbióticos e fibras dietéticas; em iogurtes promovendo efeito simbiótico além do próprio efeito probiótico do iogurte; em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar; em sucos e néctares frescos, produtos de confeitaria, molhos, entre outros (Passos & Park, 2003).

Há no mercado formulações mastigáveis para crianças (Herbasaur® Chewable Bifidophilus for Kids) com adição de frutooligosacarídeos (Nature's Sunshine Products-Internet, 2008). Os FOS podem ainda ser utilizados como ingredientes de barras de cereais, que podem ter diferentes formulações para diferentes finalidades. As barras consumidas no desjejum consistem tipicamente de altos níveis de carboidratos, pouca proteína, pouca gordura e pouca fibra. A substituição de parte dos carboidratos, geralmente sacarose, frutose, amido e maltodextrinas, por FOS, pode aumentar a quantidade de fibras desta categoria de barras, melhorando suas características nutricionais. Barras consumidas com diferentes finalidades são adicionadas de FOS, como por exemplo, barras energéticas para praticantes de esportes e aquelas usadas como alimentos funcionais especificamente (Izzo et al., 2001). Além disso, podem ser utilizados em produtos alimentares para animais, apresentando os mesmos efeitos prebióticos (Strickling et al., 2000), e também como aditivos alimentares para suínos e aves domésticas (Fishbein et al., 1988).

2.5. O mercado de FOS

Em diversos países, os alimentos funcionais têm sido amplamente comercializados e consumidos, sendo o mercado mundial estimado em mais de 33 bilhões de dólares americanos (US\$). No Japão eles possuem o status FOSHU (sigla em inglês para *Food of Specified Health Use*) e, no ano 2000, o valor de mercado dos

produtos dessa categoria foi de US\$ 2 bilhões, movimentando cerca de US\$ 14 bilhões. O mercado europeu de alimentos funcionais contribui com US\$ 4 a 8 bilhões, que representa menos de 1% do total do mercado de alimentos (Menrad, 2003). Comercialmente, são suplementos caros, a cerca de US\$ 0,20 por grama e, o consumo nas doses recomendadas pode custar US\$ 2,00 por dia (Passos & Park, 2003). Atualmente são considerados ingredientes e não aditivos alimentares.

Estima-se que na dieta do oeste da Holanda seja consumido de 2 a 12g de FOS por dia per capita (Hartemink et al., 1997). No Japão há consumo diário estimado em $13,7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Spiegel et al., 1994). A aprovação de FOS no Japão estabeleceu como consumo diário aceitável cerca de $0,8 \text{ g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia. Encontra-se neste país o maior mercado comercial de FOS, com um volume comercializado de mais de 400 toneladas em 1990, sugerindo que esse seja um dos produtos mais populares entre os alimentos funcionais no país (Yun, 1996). Os japoneses produziram o equivalente a US\$ 46 milhões de diferentes tipos de oligossacarídeos em 1990, sendo projetado um mercado de alimentos funcionais no valor de US\$ 4,5 bilhões, com crescimento anual de 8% em 1995 (Tomomatsu, 1994). Atualmente, a média diária de consumo de FOS por pessoa tem sido estimada em 1 a 4 g nos Estados Unidos e, na Europa, em 3 a 11 g (Sangeetha et al., 2005b).

Há no mercado alguns produtos contendo FOS de origem microbiana. Um desses produtos é produzido pela Meiji Seika Ltd (Tóquio, Japão), e comercializado como *Neosugar*, *Profeed*, *Meioligo*, ou *Nutraflora*. Outro produto, o *Actilight* é produzido e comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (Hartemink et al., 1997; Hidaka et al., 1986). Os FOS de origem vegetal são comercializados como *Raftilose* quando produzido pela Orafiti Ltda da Bélgica, ou como *Frutafit* quando produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda (Roberfroid, 1993).

2.6. Novas tendências na produção de FOS: melhoramento genético da frutossiltransferase e uso de substratos de baixo valor agregado

A enzima frutossiltransferase (FTase) é uma enzima de expressão constitutiva (Bergeron et al., 2000). Diversos estudos moleculares envolvendo caracterização e regulação gênica dos genes que codificam para FTase foram realizados em microrganismos. O gene *levU*, que codifica para frutossiltransferase de *Zymomonas mobilis*, foi clonado e seqüenciado, identificando uma *ORF* (*Open Reading Frame*) de 1.272 pb, uma seqüência de aminoácidos deduzida de 423 resíduos e um peso molecular de 46.725 Da (Song et al., 1993). O sítio de início da transcrição do gene *ftf*, que codifica para FTase em *Actinomyces naeslundii*, foi mapeado, confirmando também que seu promotor é funcional (Bergeron et al., 2000). A expressão de *ftf* pode ser regulada por carboidratos, e a presença de frutose pode induzir a expressão de FTase na superfície celular em biofilmes de *Streptococcus mutans* (Rozen et al., 2004). Sorbitol e manitol, açúcares não-cariogênicos, aumentam consideravelmente a expressão de *ftf* em *Streptococcus mutans* no final da fase exponencial (Shemesh et al., 2006).

Experimentos recentes revelaram que a secreção de frutossiltransferase é dependente de uma via de secreção de proteínas do tipo II (Arrieta et al., 2004). A FTase de *Acetobacter diazotrophicus*, ou levansucrase LsdA (EC 2.4.1.10), acumula-se no periplasma antes da secreção, sendo esse um evento típico de uma via de secreção de proteínas do tipo II. Nenhuma região transmembrana putativa foi prevista na estrutura secundária de LsdA, indicando que esta não está ligada à membrana. As enzimas extracelulares e as enzimas presentes no periplasma apresentaram, ambas, as mesmas propriedades, indicando que a enzima é enovelada antes de ser secretada. Além disso, LsdA é completamente protegida na extremidade N-terminal por um resíduo pGlu, e é transportada em duas etapas: processamento do peptídeo sinal N-terminal de 30 resíduos durante o transporte para o periplasma (1) e posterior translocação do intermediário periplasmático protegido na extremidade N-terminal para fora da membrana sem clivagem proteolítica (2), sendo que essa última etapa possui uma velocidade limitante (Hernandez et al., 1999).

A Engenharia Genética tem se mostrado uma boa ferramenta para o melhoramento da produção de FOS por enzimas microbianas. Trujillo et al. (2001) fusionaram um fragmento do gene *lsdA*, que codifica para a enzima frutossiltransferase de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, com a seqüência sinal *pho 1*, que está sob o controle do promotor AOX1, de *Pichia pastoris*. O AOX1 é um promotor forte e facilmente induzível por metanol, constituindo-se, portanto em um excelente sistema de expressão de proteínas recombinantes. Ao serem induzidas com metanol as células de *P. pastoris* produziram enzimas LsdA ativas, mesmo sem apresentar os 57 primeiros aminoácidos. Essas enzimas recombinantes revelaram uma eficiência de aproximadamente 70 % (p/p) na produção de FOS, e um consumo de mais de 85% de sacarose ao longo das 24 h de reação.

Uma boa alternativa para reduzir os custos com a produção de FOS é o uso de substratos de baixo valor agregado. Sangeetha et al. (2004b) produziram a enzima frutossiltransferase por *Aspergillus oryzae* utilizando a fermentação semi-sólida de subprodutos agrícolas, como farelo de cereal, produtos de milho, bagaço de cana de açúcar, bagaço de mandioca e subprodutos do processamento de café e chá. Os melhores subprodutos agrícolas encontrados para produzir frutossiltransferase foram o farelo de arroz, o farelo de trigo e o germe de milho. Em 2006, um processo patenteado garantiu a produção de grandes quantidades da enzima β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* por fermentação em meio de cultura líquido ou semi-sólido, utilizando nesse último preferencialmente o farelo de trigo como substrato, se mostrando um processo eficiente para a produção de FOS em escala industrial (Park et al., 2006).

Cruz et al. (1998) conduziram ensaios para a produção de FOS a partir de micélio imobilizado de *Aspergillus japonicus* em gel de alginato de cálcio, sendo a enzima FTase previamente produzida em meio enriquecido com melaço de cana de açúcar. A reação se processou por 4 h a temperatura de 55°C, pH 5,5 e sacarose a 65% (p/v), sendo produzidos 61,3% (p/p) de FOS. Dorta et al. (2006) também utilizaram melaço de cana de açúcar como fonte de sacarose (5%) e extrato de levedura como fonte de nitrogênio para o crescimento dos microrganismos *Aspergillus japonicus* e

Aspergillus niger para produção da enzima frutossiltransferase. O total de FOS obtido foi de 53 e 57% (p/p) para *A. japonicus* e *A. niger*, respectivamente.

Três diferentes linhagens de *Aureobasidium pullulans* foram estudadas quanto à produção de frutooligossacarídeos, destacando-se a linhagem KCCM 12017, que apresentou maior atividade específica de transfrutossilção intracelular e a produção de enzima diretamente proporcional ao crescimento. Foram utilizadas células intactas de *A. pullulans*, com as quais foram produzidos 166 g.L⁻¹ de FOS a partir de melão de cana de açúcar, cuja concentração de sacarose era 360 g.L⁻¹. As condições reacionais utilizadas foram temperatura de 55°C, pH 5,5 e tempo de reação maior que 24 h (Shin et al., 2004).

Ghazi et al. (2006) utilizaram o xarope e o melão provenientes do processamento de beterraba doce como fonte de sacarose e meio para a reação de transfrutossilção. Foi utilizada uma preparação comercial de pectinase de *Aspergillus aculeatus*, Pectinex Ultra SP-L, imobilizada em Sepabeads EC-EP5. A reação de transfrutossilção foi conduzida a 60°C e pH 5,5, obtendo-se bons índices na produção de FOS, que chegaram a atingir 56 e 49% de FOS (p/p), para o xarope e o melão respectivamente, no total de carboidratos da mistura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de microrganismos do Baru

Para o isolamento de microrganismos utilizou-se amostras de Baru originadas de duas cidades do estado de Goiás, Pirenópolis (safra 2005) e Jussara (safras 2005 e 2007). Os frutos foram sanitizados com solução à base de hipoclorito de sódio a 200 ppm durante 15-20 min. A polpa foi ralada e inoculada em erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL dos meios de cultura líquidos YM e meio de sacarose. O meio YM era constituído de peptona (0,5%), glicose (1%), extrato de malte (0,3%) e extrato de levedura (0,3%) e o meio de sacarose era constituído de sacarose (40%), extrato de levedura (0,5%) e uréia (0,1%). Incubou-se as amostras em agitador rotatório a 200 rpm, 30°C por 72 h. Posteriormente, inoculou-se as respectivas culturas em placas de petri contendo os mesmos meios acrescidos de 2% de ágar, deixando-se em estufa a 30°C por 3 dias. As colônias isoladas foram em seguida repicadas em ágar inclinado de mesma composição, incubadas a 30°C e depois mantidas a 5°C (Oliveira, 1997).

3.2. Pré-seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase

3.2.1. Desenvolvimento do inóculo

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de esporos ou massa celular com cinco dias de crescimento para 50 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 250 mL, contendo 1% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Incubou-se em agitador rotatório a 200 rpm, 30°C por 24h. Além das 26 linhagens microbianas isoladas do Baru foram testadas outras 19 linhagens pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

3.2.2. Produção da enzima frutossiltransferase

O inóculo com 24 h de crescimento foi transferido (10% v/v) para 50 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 250 mL, contendo 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 30°C por 72h (Sangeetha et al., 2005). Após esse período, centrifugou-se o meio fermentado a 11.000 x g a 4°C por 10 min para separação do sobrenadante e da massa celular, quando se tratava de bactérias ou leveduras, sendo que no caso de fungos filamentosos essa separação foi realizada por simples filtração. A enzima frutossiltransferase extracelular foi concentrada a partir do meio de fermentação utilizando etanol a 0-4°C numa proporção de 70% (v/v) (Maugeri & Hernalsteens, 2007), seguindo-se uma centrifugação a 11.000 x g a 4°C por 10 min para obtenção do precipitado contendo a enzima, que posteriormente foi ressuspendido em tampão acetato 0,1 M, pH 4,5.

3.2.3. Determinação da atividade de frutossiltransferase

A atividade enzimática foi determinada em um meio de reação contendo 50% de sacarose em tampão acetato 50 mM (pH 4,5), acrescido de 10 % (v/v) da suspensão enzimática obtida na etapa anterior, incubando-se a 50°C (Maugeri & Hernalsteens, 2007). Foram coletadas amostras no tempo inicial ($t=2$ minutos) e no tempo 20 minutos, avaliando-se a quantidade de glicose (Kit Glicose Oxidase comercial) e de açúcares redutores (método de Somogyi-Nelson). Uma unidade de atividade enzimática de frutofuranosidase (U_H) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um μmol de sacarose por minuto, e uma unidade de atividade de frutossiltransferase (U_{TF}) foi definida como a quantidade de enzima necessária para transferir um μmol de frutose por minuto, sob as condições de ensaio estabelecidas (Maugeri & Hernalsteens, 2007). As atividades FA e FTase foram determinadas a partir de duas equações:

$$1^{\text{a}}: R = G + F \rightarrow F = R - G$$

Equação 1

$$2^{\text{a}}: F' = G - F \rightarrow F' = 2G - R$$

Equação 2

onde G representa a quantidade de glicose medida com o Kit Glicose Oxidase comercial, R os açúcares redutores quantificados pelo método de Somogyi-Nelson, F a

quantidade de frutose e F' a quantidade de frutose transferida para a formação dos frutooligossacarídeos. Foi estabelecida uma relação entre as atividades de frutossiltransferase e de frutofuranosidase para efeito de comparação das diferentes enzimas obtidas no item 3.2.2 e, as linhagens cujas enzimas apresentaram as maiores razões (U_{TF} / U_H) foram escolhidas para o estudo da reação de síntese de FOS.

3.3. Seleção de microrganismos produtores de FOS

3.3.1. Produção de FOS por via enzimática

Para cada uma dos 13 microrganismos selecionados foi feito um estudo da produção de FOS. A partir da enzima obtida no item 3.2.3, a reação se processou em pequenos frascos cilíndricos de vidro contendo 5 mL de meio reacional, constituído de 50% de sacarose (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 1,0 mL da preparação enzimática parcialmente purificada obtida na etapa anterior. O meio de reação foi incubado a 50°C e 100 rpm durante 72 h e foram coletadas amostras nos tempos 6, 12, 24, 48 e 72 h.

3.3.2. Análise quantitativa da produção de FOS

A identificação e a análise quantitativa dos açúcares sacarose, glicose, frutose, 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose em cada tempo de reação (6, 12, 24, 48 e 72 h) foram realizadas através de cromatografia de troca iônica com detector amperométrico pulsado (HPLC-PAD). A cromatografia foi realizada em uma coluna Carbobac PA-100 a 22-24°C, utilizando uma bomba de gradiente GP50, um detector eletroquímico E40 e o programa PEAKNET, todos DIONEX (USA). Os açúcares foram eluídos em hidróxido de sódio 50 mM com um gradiente linear de acetato de sódio (0-200 mM) e a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ (Maugeri & Hernalsteens, 2007). O microrganismo cuja enzima que apresentou a maior produção de FOS foi selecionado para um estudo detalhado de suas propriedades bioquímicas.

3.4. Caracterização bioquímica da frutossiltransferase

3.4.1. Efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática

Para a determinação dos valores ótimos de pH, temperatura e concentração de substrato para a atividade enzimática foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com três variáveis, como apresentadas na tabela 2, pH (3,5-6,5), temperatura (45-70°C) e concentração de sacarose (100-700 g L⁻¹), utilizando o tampão acetato de sódio 50 mM. Para os outros parâmetros como agitação e percentual da suspensão enzimática na reação foram mantidos valores fixos, 200 rpm e 10 % (v/v), respectivamente. Assim foram realizados 18 ensaios incluindo 4 pontos centrais e a atividade enzimática calculada segundo item 3.2.3. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

Tabela 2: Fatores e seus respectivos níveis estudados no delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para atividade enzimática

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	3,5	4,1	5,0	5,9	6,5
Temperatura (°C)	45	50,1	57,5	64,9	70
Sacarose (g/L)	100	221,4	400	578,6	700

3.4.2. Efeito da temperatura na meia vida enzimática

Para determinar o efeito da temperatura na meia vida da enzima, alíquotas da suspensão enzimática foram incubadas em diferentes valores de temperatura (50-55-60-65-70°C), sendo retiradas frações em intervalos de tempo definidos posteriormente para cada valor de temperatura. Os ensaios foram feitos em triplicatas e, após este período, a atividade residual de frutossiltransferase foi determinada como descrito no item 3.4.1 em condições otimizadas. A partir dos valores de atividade residual obtidos foram determinados os tempos de meia vida em cada uma das

temperaturas estudada. Os resultados foram dados na forma U_t/U_0 , onde U_t equivale à média das atividades de transfrutossilção das triplicatas em cada tempo de acompanhamento da estabilidade térmica e, U_0 equivale à média das atividades de transfrutossilção das triplicatas da FTase sem tratamento térmico. Os parâmetros termodinâmicos k_d , E_{ad} , $t_{1/2}$, $t_{10\%}$, D e z foram determinados a partir dos valores de U_t/U_0 (Oliveira, 2007):

Constante (k_d)

A constante de desnaturação k_d foi determinada como sendo a inclinação da reta construída a partir dos logaritmos naturais de U_t/U_0 plotados em função do tempo em minutos. A fase declínio proporcional da velocidade de reação pode ser expressa matematicamente na forma de k_d .

Energia de ativação da desnaturação (E_{ad})

A energia necessária para promover a ativação da desnaturação (E_{ad}) foi determinada pela multiplicação da constante R ($8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) pela inclinação da reta construída a partir da linearização proposta por Arrhenius na forma de $\ln(k_d)$ versus $10^3/T$.

Meia vida ($t_{1/2}$)

O tempo necessário para que a enzima tenha sua velocidade de reação reduzida à metade ($t_{1/2}$) foi determinado a partir de k_d , pela seguinte equação:

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

Equação 3

Valor de redução decimal (D)

O valor de redução decimal D (tempo necessário para reduzir a velocidade de reação a 10%) foi determinado pela seguinte equação:

$$D = \frac{2,3026}{k_d}$$

Equação 4

Valor z

A variação de temperatura requerida em um sistema para que ocorra uma redução decimal na velocidade de reação (valor z) foi determinada pelo inverso da inclinação da reta construída a partir de $\log(D)$ versus T.

3.4.3. Efeito do substrato na cinética reacional

Para o estudo do efeito da concentração do substrato na cinética reacional a reação enzimática foi conduzida em triplicata em tampão acetato (pH 5,0) a 55°C, sendo a concentração de sacarose de 100 a 700 g/L. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.4.1 e o valor obtido para cada concentração corresponde ao valor da velocidade utilizada no modelo clássico de inibição (equação 5). As constantes cinéticas v_{\max} , k_m e k_i foram obtidas utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008) diretamente dos pontos experimentais obtidos (Oliveira, 2007). O parâmetro v_{\max} corresponde à velocidade máxima da reação, que ocorre quando a enzima está saturada pelo substrato, estando este termo relacionado à eficiência catalítica da enzima. A constante k_m representa a concentração de substrato que proporciona a metade da velocidade máxima da reação, sendo por isso associado à afinidade da enzima pelo substrato. A constante de inibição k_i corresponde à menor concentração de substrato em que este causa inibição na velocidade de reação (Dixon & Webb, 1979).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{[S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right) + K_m} = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[S]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]}}$$

Equação 5

Paralelamente as constantes cinéticas v_{\max} , k_m e k_i foram estimadas por dois métodos de linearização (Oliveira, 2007).

- a) O parâmetro v_{\max} foi calculado pelo método de Lineweaver-Burk (equação 6), sendo a regressão linear obtida do tipo $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{[S]} + b$, onde a inclinação da reta corresponde ao termo $\frac{k_m}{v_{\max}}$ e a intersecção com eixo y o valor $\frac{1}{v_{\max}}$.

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Equação 6

- b) O parâmetro k_m foi calculado pelo método de Eadie-Hofstee (equação 7), sendo a regressão linear obtida do tipo $v = -a \cdot \frac{v}{[S]} + b$, onde a inclinação da reta equivale a k_m e a intersecção a v_{\max} .

$$v = -k_m \cdot \frac{v}{[S]} + v_{\max}$$

Equação 7

- c) O parâmetro k_i foi calculado no ponto onde a primeira derivada se anula, conforme a equação 8, onde o valor S^* corresponde ao ponto de inflexão.

$$\frac{dv}{dS} = 0 \rightarrow S^* = \sqrt{k_m \cdot k_i}$$

Equação 8

3.4.4. Efeito de diferentes formulações de soluções tampões na atividade enzimática

Foi feito um estudo do comportamento da enzima em três soluções tampões, tampão acetato, tampão citrato e tampão citrato-fosfato. As reações para determinação da atividade foram conduzidas em triplicata a pH 5,0, temperatura 55°C e concentração de sacarose 450 g/L e os valores da atividade enzimática (U_{TF}) foram obtidos conforme

item 3.2.3. Os dados da resposta U_{TF} foram analisados no software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008). As condições de reação (pH, temperatura e concentração de sacarose) estabelecidas para realização deste estudo foram as condições ótimas encontradas para atividade enzimática, conforme descrito no item 3.4.1.

3.5. Identificação do gênero da linhagem produtora de frutossiltransferase

A identificação da linhagem selecionada para estudo detalhado da enzima frutossiltransferase foi realizada em nível de gênero pela técnica microbiológica de microcultivo sobre lâmina em placa de Petri (Downes & Ito, 2001). O microrganismo foi cultivado em placa de Petri durante 24 h a 30°C em um fragmento de meio PDA, de aproximadamente 1 cm² de área, sobre uma lâmina de vidro e coberto com uma lamínula. Após o período de crescimento as células fúngicas aderidas à lâmina e à lamínula foram coradas com *cotton blue*, sendo posteriormente observadas ao microscópio óptico. Foram feitas fotomicrografias com o auxílio de um aparato fotográfico e um computador acoplados ao microscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de microrganismos do Baru

Foram isoladas 26 linhagens microbianas endofíticas da polpa do Baru, sendo 8 fungos filamentosos e 18 bactérias e/ou leveduras. Todas as 26 linhagens foram estudadas quanto à produção de frutossiltransferase.

Tabela 3: Linhagens microbianas isoladas do Baru e seus locais de origem

Baru (safra)	Cidade	Nº Linhagens isoladas
2005	Jussara/GO	15
2005	Pirenópolis/GO	11

4.2. Pré-seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase

O estudo da produção de frutossiltransferase foi conduzido com 54 linhagens de microrganismos, sendo 26 linhagens isoladas da polpa do Baru e outras 28 pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Bioaromas, tendo sido isoladas de fontes variadas, como diversas frutas e vegetais. Os extratos enzimáticos concentrados das diferentes linhagens estudadas foram avaliados quanto às atividades de frutossiltransferase e de frutofuranosidase, sendo os resultados mostrados na tabela 4.

A escolha das linhagens para estudos posteriores da síntese de FOS foi baseada principalmente no parâmetro $U_{TF}/U_H \cdot 100$ (Oliveira, 2007), sendo assim escolhidas 12 linhagens que apresentaram os maiores valores para essa razão. Em se tratando de fungos filamentosos, foram escolhidas as linhagens que apresentaram as maiores razões quando comparadas a outras linhagens morfológicamente idênticas estudadas. Além das 12 linhagens selecionadas conforme esses critérios, foi selecionada ainda a linhagem LBJBSG-7, pelo fato de estudos prévios no Laboratório de Bioaromas indicarem ser essa uma linhagem produtora da enzima frutossiltransferase.

Tabela 4: Comparação entre as atividades enzimáticas das preparações enzimáticas parcialmente purificadas das diferentes linhagens estudadas

Linhagem	pH após 72h	U _H	U _{TF}	U _{TF} /U _H *100**
Bactérias e/ou Leveduras				
LBJCS6	6,95	1,41	0,00	0,00
LBJCS7	6,59	1,01	0,56	55,99
LBJCS8	6,67	1,69	1,25	74,12
LBJCS9	7,00	2,35	2,30	98,03
LBJCS10	6,80	1,83	0,00	0,00
LBJCS11	6,54	2,66	2,26	85,20
LBJCS15*	6,37	2,64	3,09	117,01
LBJCS16	7,24	1,48	0,00	0,00
LBJCS17	7,44	1,91	0,00	0,00
LBJCS18	7,46	1,21	0,00	0,00
LBJCS19	7,06	1,37	0,00	0,00
LBJCS20	7,16	2,02	0,00	0,00
LBJCS21	6,70	3,28	0,00	0,00
LBJCS22	7,30	2,36	0,00	0,00
LBJCS23*	3,87	1,52	1,79	117,50
LBJCS24	4,22	1,19	0,00	0,00
LBJCS25	3,87	0,83	0,00	0,00
LBJCS26*	3,82	1,73	1,83	105,70
LBJBSG-7*	3,86	1,07	0,15	14,25
LBJCS27	7,06	1,03	0,00	0,00
LBJCS28	6,86	2,06	1,34	64,88
LBCAF10.5	4,16	0,99	0,00	0,00
LBCAF14	3,98	4,17	3,76	90,19
LBJBS9-4	3,54	0,97	0,65	67,13
LBJBS13-2*	6,70	1,20	1,47	122,51
LBJBS13-4	6,91	1,05	1,08	103,27
LBCAF3	7,20	0,86	0,00	0,00

Tabela 4: Continuação

Linhagem	pH após 72h	U_H	U_{TF}	U_{TF}/U_H*100**
Bactérias e/ou Leveduras				
LBCAF86	7,03	1,67	1,50	90,11
LBCAF19.32	5,77	1,10	0,78	70,44
LB5a	7,07	1,22	0,00	0,00
Fungos Filamentosos				
LBJCS1*	4,04	4,52	5,31	117,55
LBJCS2	3,74	4,00	4,00	99,55
LBJCS3	3,76	6,15	6,63	107,67
LBJCS4	4,41	1,94	2,07	107,09
LBJCS5	2,84	14,91	15,96	107,07
LBJCS12*	4,34	23,94	25,89	108,16
LBJCS13	4,05	22,25	23,60	106,08
LBJCS14	4,17	24,35	27,02	110,95
LBCAF10.2	3,95	9,44	9,27	98,22
LBCAF10.8	2,60	12,30	11,14	90,59
LBAPD18*	5,03	5,09	7,09	139,19
LBJBSR-1*	3,05	11,62	14,09	121,30
LBMP6*	4,29	2,18	2,78	127,51
LB152B	3,63	1,19	0,00	0,00
LBJBS2010*	2,49	3,85	4,85	126,15
LBJBS22M	4,53	0,76	0,52	68,62
LBJBS9-3	3,60	0,81	0,59	72,63
LBCAF10.2*	2,30	11,62	12,35	106,23
LBCAF12.1	2,48	9,21	8,67	94,16
LBCAF15.1	7,10	0,73	0,00	0,00
LBCAF15.2*	2,04	25,75	27,11	105,30
LBCAF21.2	1,94	11,44	11,67	102,07
LBCAF22	2,31	14,69	13,05	88,87
LBCAF25	2,03	10,98	8,38	76,32

* As linhagens escolhidas para o estudo da síntese de FOS estão destacadas

** O parâmetro (UTF/UH*100) indica a força de transfrutossilagem, dada pela razão entre a atividade de transfrutossilagem (UTF) e a atividade de hidrólise (UH)

4.3. Seleção de microrganismos produtores de FOS

Os ensaios para identificar a atividade enzimática de frutossiltransferase foram realizados com 54 linhagens microbianas, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, resultando em 13 linhagens com potencial para o estudo da síntese de FOS. Analisando-se a tabela 4 é possível observar que, das 13 linhagens selecionadas, as enzimas de bactérias e leveduras apresentaram baixas atividades enzimáticas, tanto U_{TF} quanto U_H , entretanto, apresentaram valores relativamente altos para a relação U_{TF}/U_H*100 . Essas mesmas enzimas, quando avaliadas quanto à síntese de oligossacarídeos, apresentaram rendimentos desprezíveis da reação de produção de FOS (tabela 5). Apesar de as atividades enzimáticas sugerirem que 13 linhagens microbianas eram potenciais produtoras de FOS, apenas quatro apresentaram produção considerável de FOS em algum momento ao longo do tempo de reação, conforme apresentado na tabela 5. Isso se deve ao fato de que os baixos valores de atividade enzimática detectados para as enzimas de bactérias e leveduras podem ter sido devido a outros fatores, que não a FTase, uma vez que a atividade de frutossiltransferase verificada no extrato enzimático concentrado foi obtida por meio de relações matemáticas que consideraram apenas os valores de açúcares redutores e de glicose, e não a medição direta da frutose no meio reacional. Assim, as outras 9 linhagens selecionadas e que não foram hábeis para sintetizar FOS, possivelmente tiveram a atividade de frutossiltransferase “mascarada” pela atividade de frutofuranosidase. Já as enzimas dos fungos filamentosos, considerados potenciais produtores de frutossiltransferase (tabela 5), apresentaram valores mais elevados para a relação U_{TF}/U_H*100 , sendo os valores das atividades enzimáticas U_{TF} e U_H também altos (tabela 4). Isto explica os rendimentos mais elevados da produção de oligossacarídeos por essas quatro linhagens (tabela 5).

A síntese de FOS por enzimas microbianas foi estudada em batelada durante 72 h. Considerando-se os rendimentos da reação de produção de oligossacarídeos descritos na literatura para enzimas FTase de diversos microrganismos (ver discussão no item 4.4.6), apenas uma linhagem de fungo filamentoso (LBAPD18) apresentou uma produção considerável de FOS (49,7% p/p),

sendo este microrganismo selecionado para realização de um estudo detalhado das características bioquímicas da FTase por ele produzida. Essa linhagem foi posteriormente identificada em nível de gênero utilizando técnicas de microscopia óptica.

No Brasil, desde o início da década de 90 têm sido reportados estudos de prospecção de novos microrganismos produtores de FOS. Foram isoladas novas linhagens de microrganismos de diversos biomas brasileiros e essas foram avaliadas quanto à produção de FOS. Os microrganismos cujas enzimas apresentaram melhores rendimentos na reação de síntese de FOS foram *Aspergillus niger* e *Aureobasidium* sp. (Park & Almeida, 1991; Oliveira, 1997).

Maugeri & Hernalsteens (2007) isolaram 495 linhagens de leveduras de diversos locais do país e, após testes preliminares e baseando-se nas atividades de frutossiltransferase e frutofuranosidase (*screening* primário), obtiveram 130 linhagens de leveduras com potencial para produção de frutossiltransferase. Posteriormente foram realizadas análises qualitativas da produção de oligossacarídeos (*screening* secundário) com as 130 linhagens pré-selecionadas, sendo que apenas quatro destas leveduras foram consideradas hábeis para a produção de FOS.

Tabela 5: Estudo da reação de síntese de FOS pelas 13 linhagens pré-selecionadas

Linhagem	GF*	G*	F*	GF ₂ *	GF ₃ *	GF ₄ *	FOS*	Tempo	FOS/U _{TF} **	Y _{FOS} Max***
LBJCS15	377,73	86,29	12,25	0	11,64	12,08	23,72	48h	7,68	4,7
LBJCS23	494,65	5,35	0	0	0	0	0	72h	0	0
LBJCS26	493,03	6,97	0	0	0	0	0	72h	0	0
LBJBSG-7	490,2	7,03	0	0	2,78	0	2,78	48h	1,73	0,6
LBJBS13-2	493,03	6,97	0	0	0	0	0	72h	0	0
LBJCS1	135,45	165,17	13,5	161,78	14,45	9,64	185,87	12h	35	37,2
LBJCS12	40,03	240,87	134,34	66,04	9,1	9,62	84,76	6h	3,27	17
LBAPD18	81,51	159,35	10,6	221,21	19,84	7,49	248,54	48h	35,05	49,7
LBJBSR-1	150,62	167,23	61,65	112,07	8,42	0	120,5	24h	8,55	24,1
LBJBS2010	426,42	48,14	22,4	0	3,05	0	9,65	48h	1,99	1,9
LBCAF10.2	45,2	235,85	212,46	0	6,49	0	6,49	72h	0,63	1,3
LBCAF15.2	0	259,05	240,95	0	0	0	0	72h	0	0
LBMP6	489,39	10,61	0	0	0	0	0	72h	0	0

* Valores apresentados em g/L.

** Razão entre a quantidade de FOS produzida e quantidade de enzima utilizada na reação de síntese de FOS.

*** Rendimento de FOS máximo (Y_{FOS} Max) é apresentado em valor percentual, fornecido pela divisão do maior valor de FOS formados durante a reação de síntese pela quantidade inicial de sacarose.

4.4. Estudo das características bioquímicas da FTase de *Penicillium* sp.

4.4.1. Identificação do gênero do microrganismo selecionado

A linhagem fúngica LBAPD18 foi identificada em nível de gênero como *Penicillium* sp. A identificação foi feita comparando-se as características morfológicas dos conídios obtidos pela técnica de microcultivo, como apresentado pela figura 2, com os conídios de espécies de fungos filamentosos já conhecidas. Existem atualmente poucos trabalhos descritos na literatura utilizando linhagens do gênero *Penicillium* para a produção de frutooligossacarídeos, sendo que a única espécie estudada foi *Penicillium citrinum* (Hayashi et al., 2000, Lim et al., 2007).

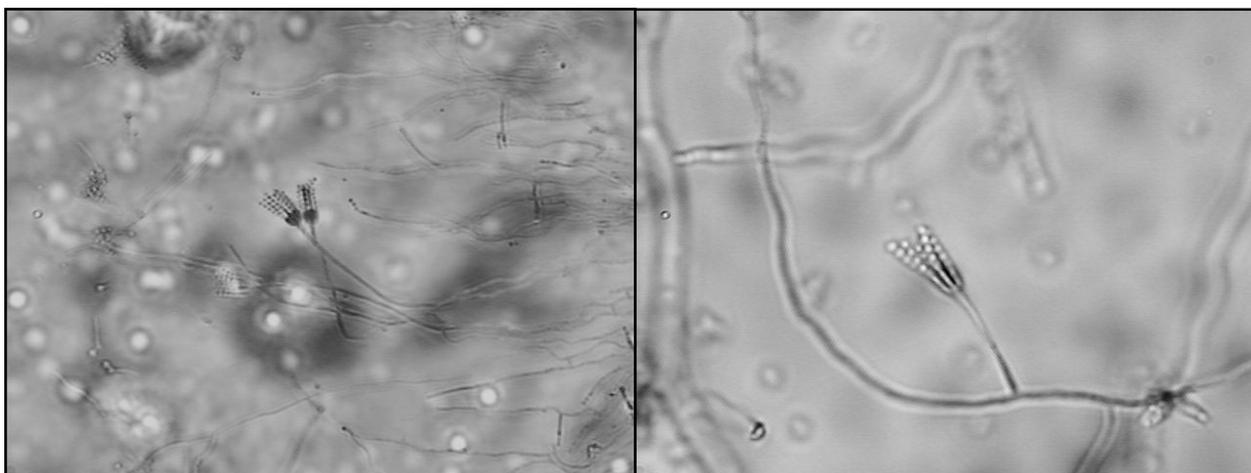


Figura 2: Fotomicrografia óptica de conídios de *Penicillium* sp. observados com aumentos de 200 e 400 vezes respectivamente

4.4.2. Efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática da frutossiltransferase de *Penicillium* sp.

O efeito do pH, da temperatura e da concentração de substrato na atividade de frutossiltransferase foi determinado como descrito no item 3.4.1. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2^3 , sendo que os níveis estudados com os valores decodificados das variáveis encontram-se na Tabela 2 e o planejamento esquematizado na Tabela 6.

As variáveis independentes foram pH, temperatura e concentração de sacarose e a variável dependente foi a atividade enzimática. Pode-se observar na Tabela 6 que a enzima parcialmente purificada apresentou os maiores valores de atividade nos pontos centrais, que variaram em torno de 320 U/mL.

Tabela 6: Configuração dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para atividade enzimática

Ensaio	pH	Temperatura	Sacarose	Atividade (U_{TF})
1	-1	-1	-1	128,17
2	1	-1	-1	180,36
3	-1	1	-1	3,95
4	1	1	-1	2,92
5	-1	-1	1	148,02
6	1	-1	1	127,86
7	-1	1	1	143,9
8	1	1	1	100,03
9	-1,68	0	0	0
10	1,68	0	0	76,54
11	0	-1,68	0	160,20
12	0	1,68	0	0
13	0	0	-1,68	79,50
14	0	0	1,68	254,03
15	0	0	0	296,95
16	0	0	0	309,85
17	0	0	0	326,43
18	0	0	0	346,85

Analisando-se a resposta atividade enzimática na tabela 6 é interessante ressaltar os ensaios 3, 4, 9 e 12, os quais apresentaram os menores valores de atividade enzimática. Os ensaios 3 e 4 foram realizados em condições de alta temperatura (64,9°C) e baixa concentração de sacarose (221,4 g/L) que, associadas, proporcionaram respostas muito baixas, 3,95 e 2,92 respectivamente. Os ensaios 9 e 12 obtiveram zero de atividade enzimática, devido às condições extremas de pH (3,5) e temperatura (70) que foram utilizadas, respectivamente, e que provavelmente levaram à desnaturação enzimática.

A tabela 7 apresenta os efeitos e os coeficientes de regressão de todos os componentes significativos e não significativos da regressão, obtidos pelo erro residual. Observa-se que os termos pH linear, temperatura linear e quadrático, sacarose linear e quadrático e a interação entre temperatura e sacarose foram significativos em intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 7: Coeficientes de regressão para a resposta atividade enzimática da FTase de *Penicillium* sp. obtidos pelo erro residual

	Efeito	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p
Média*	318,906	318,9064	15,36340	20,7575	0,000000
(1) pH (L)	16,967	8,4836	8,32684	1,0188	0,338105
pH (Q)	-189,265	-94,6326	8,65216	-10,9375	0,000004
(2) Temperatura °C(L)*	-88,313	-44,1566	8,32684	-5,3029	0,000726
Temperatura °C(Q)*	-159,687	-79,8433	8,65216	-9,2281	0,000015
(3) Sacarose (L)*	72,922	36,4608	8,32684	4,3787	0,002353
Sacarose (Q)*	-98,409	-49,2043	8,65216	-5,6869	0,000461
1L by 2L	-19,233	-9,6165	10,87954	-0,8839	0,402529
1L by 3L	-28,798	-14,3988	10,87954	-1,3235	0,222249
2L by 3L*	67,429	33,7143	10,87954	3,0989	0,014691

*Os parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança estão destacados

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na tabela 8. A tabela mostra os resultados do teste F, em que o valor de F calculado deve ser superior ao valor de F tabelado pré-determinado, em intervalo de confiança de 95%, para que os modelos matemáticos sejam satisfatórios. O valor de F calculado foi aproximadamente 12 vezes superior ao valor tabelado, portanto nesse caso é permitida a construção do modelo matemático (equação 9). Outro parâmetro analisado é o coeficiente de correlação (R^2), cujo valor foi igual a 0,9672, sugerindo que

96,72% da variação total para a resposta atividade enzimática é atribuída ao modelo matemático, enquanto que 3,28% não o é. A partir dos valores do coeficiente de regressão pode-se criar um modelo matemático para o cálculo da atividade enzimática, o que possibilita a determinação da atividade em qualquer valor de pH e temperatura dentro da faixa estudada, possibilitando assim otimizar o valor de atividade enzimática. Entretanto, a validação desse modelo e a verificação da adequação do modelo só foi possível após a realização da análise de variância (ANOVA). A equação 9 representa o modelo codificado de 2ª ordem para a atividade enzimática.

Tabela 8: Análise de variância no estudo do efeito do pH, temperatura e concentração de substrato na atividade enzimática da FTase de *Penicillium* sp.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab(6, 11; 0,95)}
Regressão	219738,45	6	36623,08	36,77	3,09
Resíduo	10956,64	11	996,06		
Falta de Ajuste	9560,08	8	1195,01		
Erro Puro	1396,55	3	465,52		
Total	230695,09	17,0			

$$U_{TF} = 318,91 - 94,63 \text{ pH}^2 - 44,16 T - 79,84 T^2 + 36,46 \text{ SAC} - 49,20 \text{ SAC}^2 + 33,71 T \text{ SAC}$$

Equação 9

O resultado da análise de variância indicou ser adequado o modelo para a predição da atividade de FTase, e as superfícies de resposta e curvas de contorno foram obtidas para cada par de variáveis independentes, como ilustrado nas Figuras 3, 4 e 5. Pode-se observar que a atividade enzimática da FTase foi ótima nas faixas de pH de 4,8 a 5,2, de temperatura de 54 a 57 °C e de concentração de sacarose de 410 a 520 g.L⁻¹. A FTase de *Rhodotorula* sp. apresentou atividade ótima em tampão acetato 50 mM (pH4,5), 60°C e sacarose à 500 g/L (Oliveira, 2007). Ghazi et al. (2006) verificaram que a frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* apresenta atividade ótima na faixa de

pH de 5,0-7,0 e a 60°C. Foi reportado ainda que a FTase de *Acetobacter diazotrophicus* possui atividade ótima em pH 5,0 (Hernandez et al., 1995).

A partir dessas faixas foram definidas condições ótimas (temperatura 55°C e concentração de sacarose 450g/L e pH 5,0) para a validação do modelo e para ensaios posteriores de atividade enzimática. O modelo codificado para a atividade de FTase (equação 9) foi validado experimentalmente nessas condições, sendo que o valor de atividade enzimática observado nessas condições experimentais foi $318,48 \pm 5,46$, e apresentou apenas 2,87% de desvio em relação ao valor predito (327,88), indicando ser esse um bom modelo para a atividade de FTase de *Penicillium* sp. O valor experimental foi obtido pela média aritmética de 3 repetições experimentais no ponto definido para validação do modelo.

A figura 6 apresenta os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo para a resposta atividade enzimática, observando-se uma boa concordância entre eles, conforme esperado pelo resultado da análise de variância.

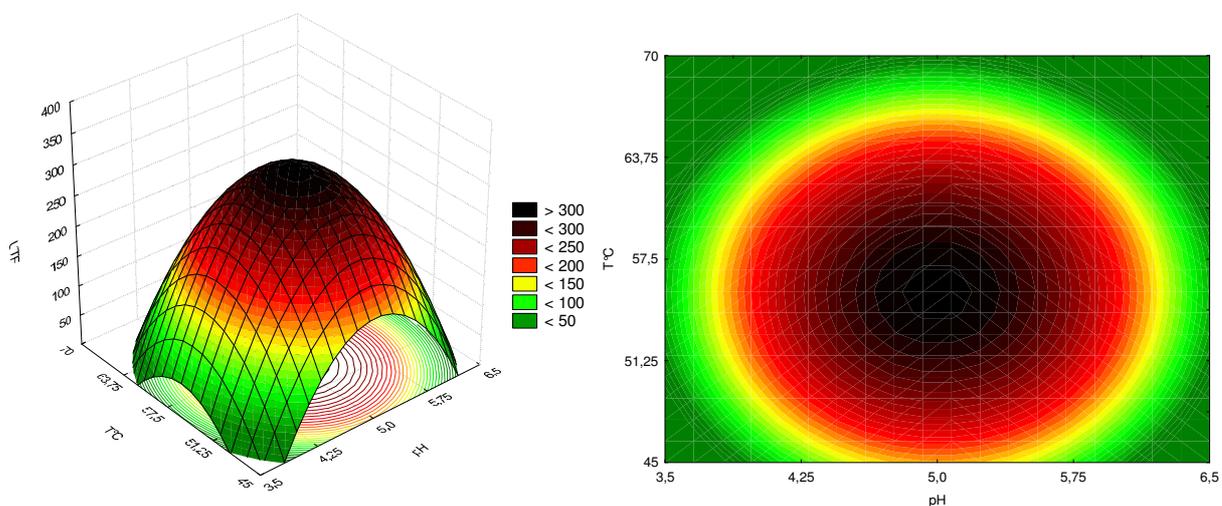


Figura 3: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de *Penicillium* sp. em função da temperatura e do pH

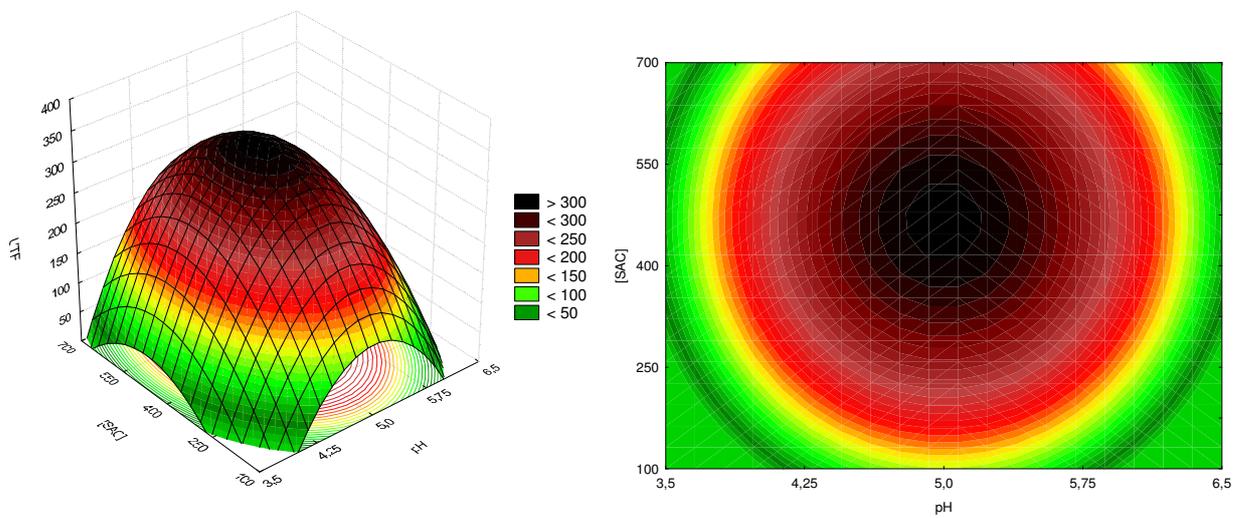


Figura 4: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de *Penicillium* sp. em função da concentração de substrato e do pH

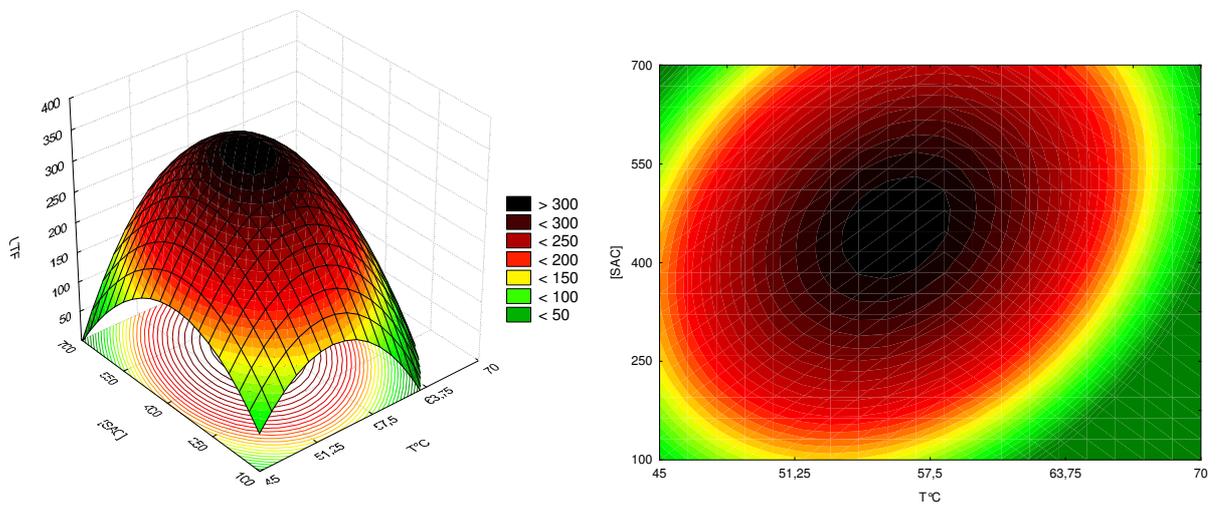


Figura 5: Superfície de resposta e curva de contorno para a atividade de frutossiltransferase de *Penicillium* sp. em função da concentração de substrato e da temperatura

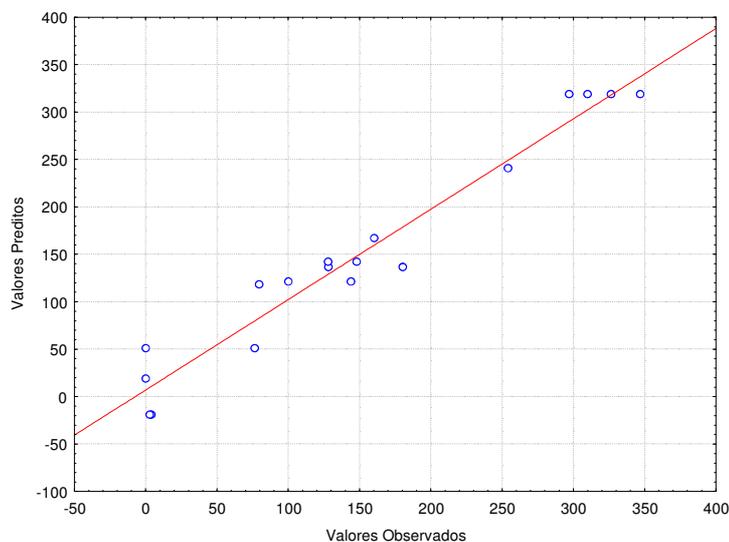


Figura 6: Valores observados *versus* valores previstos da atividade de frutossiltransferase de *Penicillium* sp.

4.4.3. Efeito da temperatura na meia vida enzimática ($t_{1/2}$)

As enzimas, devido à sua natureza, são susceptíveis à desativação ou mesmo à desnaturação, causadas por diversos fatores, tais como pH, forças iônica e mecânicas, substâncias, e em variadas faixas, dependendo das propriedades de cada enzima, o que torna importante o estudo da cinética de desativação/desnaturação (Doran, 2002). A equação 10 representa uma relação matemática onde a meia vida pode ser predita em função da temperatura (em Kelvin):

$$t_{1/2} = \frac{0,6931}{A_d} \times \left[e^{\left(\frac{E_{ad}}{R} \right) \times \left(\frac{1}{T} \right)} \right]$$

Equação 10

onde A_d representa a constante de Arrhenius e E_{ad} a energia requerida para promover a ativação da desnaturação e, a constante R vale $8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

Os parâmetros termodinâmicos foram determinados conforme descrito no item 3.4.2. O perfil de k_d , do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e dos valores de redução decimal (D) da enzima FTase de *Penicillium* sp. estão apresentados na tabela 9. É importante ressaltar que os coeficientes das regressões que originaram os valores de k_d são todos

acima de 0,96, indicando um bom ajuste dos dados. Pela observação dos valores D é possível afirmar que a enzima é mais estável em temperaturas próximas de 45°C ($D=193,496 \text{ min}^{-1}$), sendo que a 50°C o valor D sofre redução de aproximadamente 81% ($D=36,724 \text{ min}^{-1}$). Isso indica que a temperatura de 50°C é muito elevada para a enzima na sua forma livre.

Tabela 9: Perfil de k_d , da meia vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal (D) da FTase de *Penicillium* sp. em diferentes temperaturas

T (°C)	k_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	D (min^{-1})	R^2
45	0,012	58,248	193,496	0,9946
50	0,063	11,055	36,724	0,9716
55	0,320	2,165	7,191	0,9654
60	0,648	1,070	3,554	0,973

A figura 7 mostra a representação gráfica dos valores de meia vida *versus* a temperatura (em Kelvin). Os valores de meia vida preditos pela equação 10 estão sendo contrastados com os valores experimentais de meia vida.

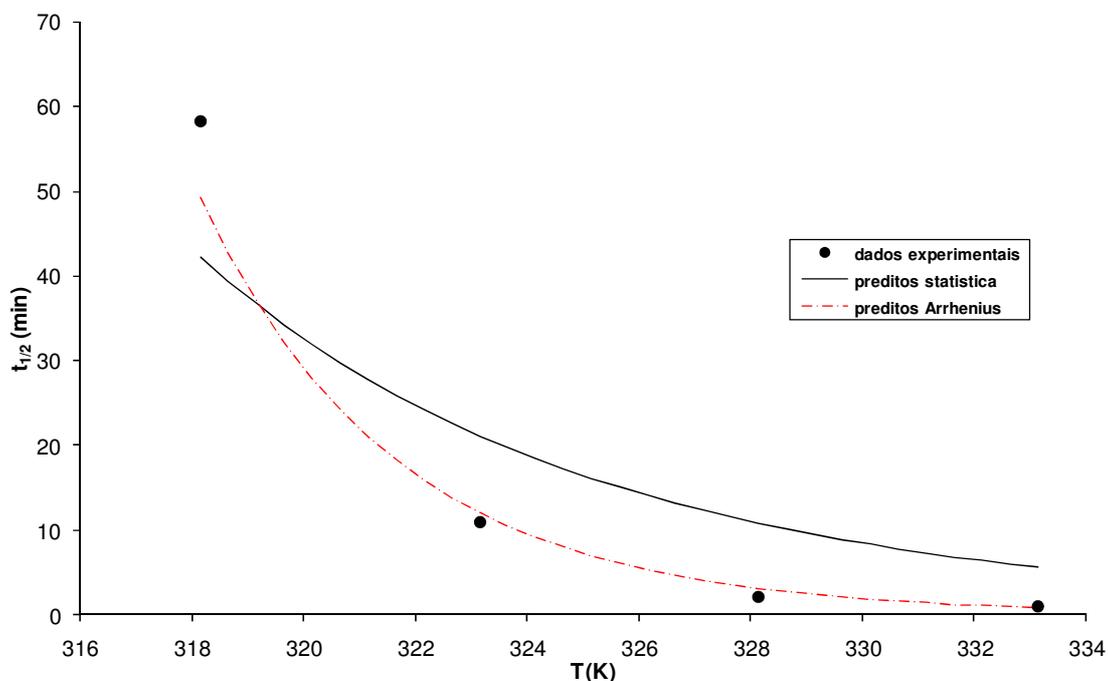


Figura 7: Efeito da temperatura sobre a meia vida da enzima FTase de *Penicillium* sp.

A energia de ativação da desnaturação E_{ad} ($240,56 \text{ kJmol}^{-1}$) foi obtida pela multiplicação da inclinação da reta da constante R pela regressão representada na figura 8, onde se obteve um R^2 de 0,97. Quanto maior o valor de E_{ad} , maior é a energia necessária para que ocorra a desnaturação da enzima e, portanto, maior é sua resistência à temperatura.

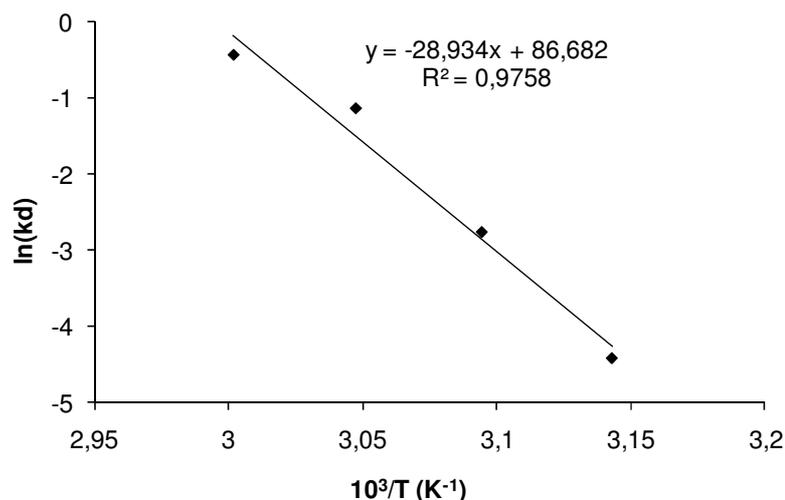


Figura 8: Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para cálculo de E_{ad} para a FTase de *Penicillium* sp.

Foi relatado um valor de E_{ad} de $297,85 \text{ kJmol}^{-1}$ para a frutossiltransferase imobilizada de *Rhodotorula* sp. em pH 4,5 (Oliveira, 2007). Ghazi et al. (2006) obtiveram um tempo de meia vida de aproximadamente 24 h numa faixa de temperatura de 30-60°C para a FTase de *A. aculeatus*, sendo que em temperaturas acima de 65°C houve a inativação da enzima. Esses dados indicam que a estabilidade térmica da FTase de *Penicillium* sp. é satisfatória quando comparada às enzimas de outros microrganismos.

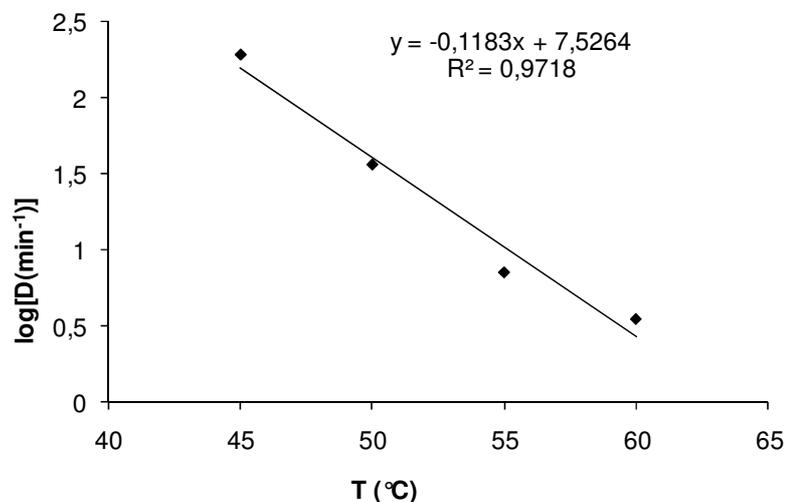


Figura 9: Linearização da redução decimal para cálculo do valor z para a FTase de *Penicillium* sp.

O valor z (8,45°C) foi obtido pelo inverso da inclinação da reta da regressão representada na figura 9. Esse valor mostra que se a temperatura for aumentada de 8,4530°C a velocidade de reação será reduzida em 90%.

A tabela 10 mostra o perfil da força de transfrutossilidação no decorrer do tempo de acompanhamento da estabilidade térmica em cada temperatura. Nota-se que a razão ou força de transfrutossilidação $(U_{TF}/U_H) \cdot 100$ manteve-se praticamente estável durante todo o tempo de acompanhamento da estabilidade térmica na temperatura de 45°C. Entretanto, nas outras temperaturas (50, 55 e 60°C) houve queda no valor de $(U_{TF}/U_H) \cdot 100$ durante o tempo de acompanhamento da estabilidade térmica. Oliveira (2007) verificou que a frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. imobilizada manteve estável a razão $(U_{TF}/U_H) \cdot 100$ até a temperatura de 60°C.

A FTase de *Penicillium* sp. apresentou queda nas atividades de frutossiltransferase e de frutofuranosidase concomitantemente ao longo do tempo nas quatro temperaturas estudadas. Na temperatura de 45°C os valores de atividade diminuíram suavemente, entretanto, nas temperaturas de 50, 55 e 60°C a queda foi bastante acentuada. Houve ainda uma ativação da enzima durante os dois primeiros minutos de acompanhamento na temperatura de 60°C. Os perfis de queda da atividade de frutossiltransferase ao longo do tempo estão representados na figura 10.

Tabela 10: Valor médio da força de transfrutoseilação (U_{TF}/U_H)*100 da enzima FTase de *Penicillium* sp. em diferentes tempos e diferentes temperaturas

45°C		50°C		55°C		60°C	
t (min)	(U_{TF}/U_H)*100						
0	146,20	0	146,20	0	146,20	0	146,20
20	138,85	10	134,00	3	129,76	2	147,53
40	140,27	20	122,94	6	134,62	4	144,42
60	133,35	30	110,88	9	121,66	6	142,83
80	130,11	40	112,51	12	67,82	10	41,52
100	147,08	50	71,51	15	63,76		

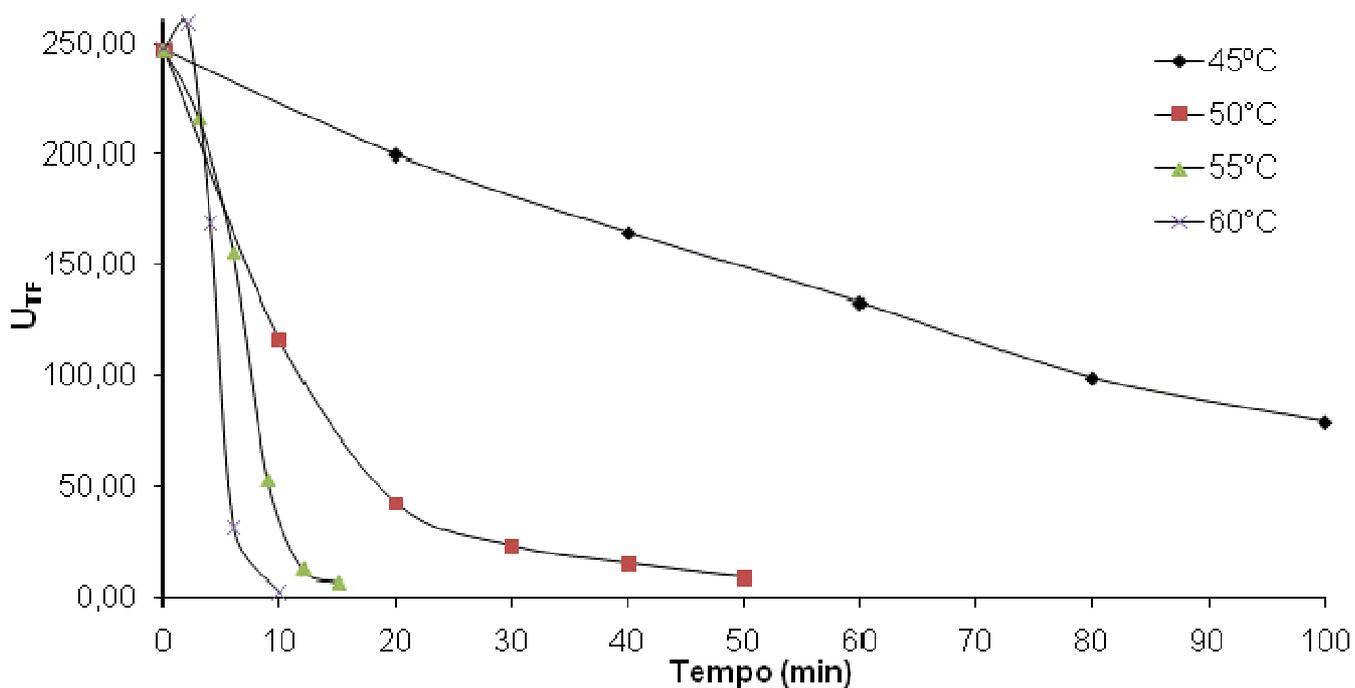


Figura 10: Comportamento da atividade de frutoseiltransferase da FTase de *Penicillium* sp. ao longo do tempo de acompanhamento nas quatro temperaturas estudadas

4.4.4. Efeito do substrato na cinética reacional

Diversas enzimas podem ter a cinética predita pelo modelo matemático de Michaelis & Menten, pelo qual se explicam as reações onde há saturação da enzima pelo substrato, não havendo, portanto, aumento na velocidade de reação pelo aumento da concentração do substrato (Dixon & Webb, 1979). Entretanto, quando a concentração do substrato causa inibição na velocidade de reação a partir de um determinado valor, o modelo que mais adequado para a velocidade de reação é expresso pela equação 5 (modelo básico de inibição).

O efeito da concentração de substrato na cinética reacional foi avaliado conforme descrito no item 3.4.3. A tabela 11 mostra os valores das velocidades de reação e as razões de transfrutosilação em cada uma das sete concentrações de sacarose testadas. Pela figura 11 é possível observar que a FTase de *Penicillium* sp. não segue a cinética proposta por Michaelis & Menten, visto houve inibição da enzima em concentrações de substrato maiores que 400 g.L^{-1} . Entretanto, os pontos em que a concentração de sacarose é menor ou igual a 400 g.L^{-1} , isto é, onde não houve inibição, podem ser preditos por esse modelo matemático. Foram testados dois métodos de linearização para obtenção dos parâmetros cinéticos v_{\max} , k_m e k_i . A constante v_{\max} foi determinada pelo método de Lineweaver-Burk (equação 6) e apresentou um valor de $91,74 \mu\text{mol.min}^{-1}$, sendo esse um valor muito acima do valor real observado ($27,59 \mu\text{mol.min}^{-1}$). O parâmetro k_m foi calculado pelo método de Eadie-Hofsteen (equação 7) e apresentou um valor de $713,56 \text{ g.L}^{-1}$, entretanto esse é um valor muito elevado e não condiz com os dados experimentais. A constante k_i foi calculada conforme a equação 8 e apresentou um valor de $224,23 \text{ g.L}^{-1}$, o qual não representa, na realidade, uma concentração mínima de substrato em que esse causa inibição na velocidade de reação.

Baseado nessa observação, dois modelos de inibição foram testados, o modelo clássico de inibição e o modelo de Hill combinado com o modelo clássico de inibição. A partir dos próprios dados experimentais foi feita a estimativa não linear dos parâmetros v_{\max} , k_m e k_i no software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008), obtendo-se os valores $74,59 \mu\text{mol.min}^{-1}$, $434,88 \text{ g.L}^{-1}$ e $318,31 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos por meio do software também não se mostraram condizentes com as

propriedades cinéticas da FTase de *Penicillium* sp. verificadas experimentalmente. Visto que a enzima sofre algum tipo de inibição, o valor de k_i deveria ser maior que o valor de k_m , já que não se pode obter uma concentração de substrato onde haja inibição (k_i), sendo esta menor que metade da concentração de substrato onde a velocidade inicial é máxima (k_m). A figura 11 mostra os perfis da curva de velocidade de reação em função da concentração de substrato sob quatro aspectos diferentes: (1) valores experimentais, (2) valores preditos pela linearização, (3) valores preditos pelo modelo de inibição combinado com o modelo de Hill utilizando valores das constantes cinéticas obtidos pela linearização e (4) valores preditos pelo modelo de inibição combinado com o modelo de Hill utilizando valores das constantes cinéticas obtidos pelo software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008).

Esses dados sugerem que o desempenho teórico está muito distante do real, provavelmente devido a um fenômeno de inibição considerável que esteja afetando a enzima, entretanto, somente com essa simples análise de *S versus v* não é possível identificar os componentes do sistema reacional que estão causando a inibição enzimática. Além disso, foram utilizados apenas sete pontos experimentais (concentrações de substrato) para a condução da análise dos parâmetros cinéticos v_{max} , k_m e k_i , sendo necessários estudos mais detalhados utilizando mais valores de concentração de sacarose. Portanto, não foi possível obter os valores reais desses parâmetros cinéticos por meio dos dados experimentais.

Possivelmente, pode estar havendo inibição por algum componente formado durante a reação, como por exemplo, GF₂, GF₃, GF₄, glicose e frutose. Isto é, existem outros termos na equação cinética da FTase de *Penicillium* sp., a qual está muito distante de ser representada por uma equação básica. Alvarado (2008) verificou um k_m de 785 g.L⁻¹ considerando-se que apenas a sacarose estaria inibindo a frutotransferase de *Rhodotorula* sp., entretanto, após a construção de uma equação cinética apropriada para essa FTase, o valor real encontrado para k_m foi de 197,9 g.L⁻¹. A FTase de *A. aculeatus* apresentou um k_m de 192,6 g.L⁻¹, quando utilizada na sua forma livre (Ghazi et al., 2006).

Tabela 11: Valores médios atividade enzimática (U_{TF}) em função da concentração de sacarose

Sacarose (g/L)	v (U_{TF})	$(U_{TF}/U_H)*100$
100	9,45	111,98
200	17,13	126,15
300	24,61	141,93
400	27,59	145,99
500	24,26	137,07
600	19,18	126,30
700	14,11	126,14

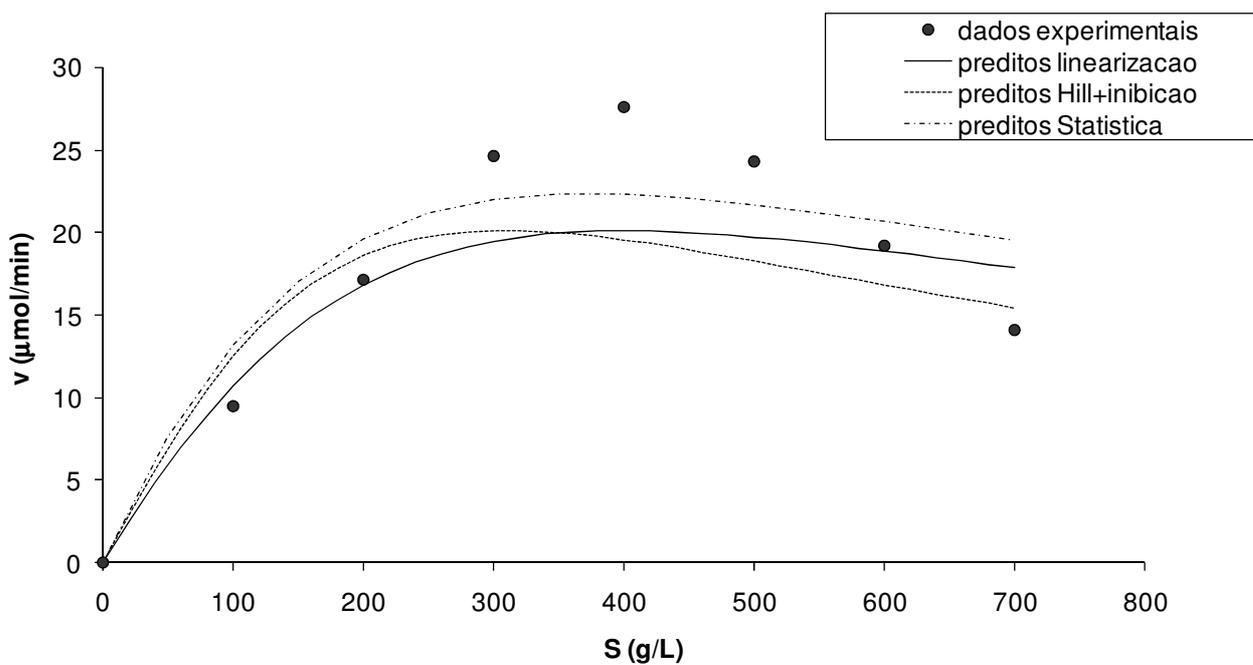


Figura 11: Efeito da concentração de substrato sobre a cinética reacional da enzima FTase de *Penicillium* sp.

4.4.5. Efeito de diferentes formulações de soluções tampões na atividade enzimática

Foi avaliado o efeito de três soluções tampões na atividade de transfrutossilacção (U_{TF}) da FTase de *Penicillium* sp. Foram eles o tampão acetato, o tampão citrato e o tampão citrato-fosfato, ambos em pH 5,0 e 450 g/L de sacarose. As médias das triplicatas das atividades enzimáticas para cada tampão foram comparadas entre si no software Statistica 8.0 (Statsoft, 2008). Os valores de U_{TF} foram estatisticamente iguais para ambos os tampões, a 10% de significância ($\alpha=0,1$), como mostra a tabela 12, sugerindo que qualquer desses tampões pode ser usado para a enzima, sem que haja ganho ou perda de atividade. Lim et al. (2007) estudaram a síntese de oligossacarídeos pela FTase de *Penicillium citrinum* em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0). A frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. apresentou melhor desempenho em tampão acetato 50 mM (pH4,5) (Hernalsteens, 2006).

Tabela 12: Análise de significância entre as médias das atividades em cada tampão avaliado

	Média 1	Média 2	p valor
Acetato vs. Citrato	317,86 ± 47,04	263,60 ± 16,22	0,1319
Acetato vs. Citrato-fosfato	317,86 ± 47,04	281,21 ± 6,10	0,2517
Citrato vs. Citrato-fosfato	263,60 ± 16,22	281,21 ± 6,10	0,1532

4.4.6. Cinética reacional da síntese de FOS pela frutossiltransferase de *Penicillium* sp.

O estudo da cinética da reação de síntese de FOS pela FTase foi conduzido durante 72 h. O valor máximo de FOS foi produzido no tempo 48 h, onde a produção alcançou 248,54 g.L⁻¹ de FOS, o equivalente a um rendimento de 49,7% (p/p) considerando-se a concentração inicial de sacarose. Resultados obtidos a partir de enzima livre, células livres ou enzimas imobilizadas de outros microrganismos variaram de 55-60% (p/v) de FOS, com uma solução concentrada de sacarose variando de 30-

50% e um tempo de reação maior que 48 h (Park & Almeida, 1991; Su et al., 1991, Toshiaki, 1995). Esses dados sugerem que o binômio *tempo de reação / concentração de sacarose* pode ser um ponto importante a ser otimizado no processo de produção de FOS.

É interessante observar que o perfil de açúcares produzido variou com o tempo de reação, conforme apresentado na tabela 13. No tempo 48 h, onde houve o maior rendimento de FOS, a constituição química dos oligossacarídeos foi de aproximadamente 89% de GF₂, 8% de GF₃ e 3% de GF₄. Entretanto, com 72 h de reação a produção de GF₃ e GF₄ foi maior, sendo 83,6% de GF₂, 13% de GF₃ e 3,4% de GF₄. A figura 12 apresenta graficamente a cinética da reação de produção de FOS e, de consumo e produção de outros açúcares presentes no meio, em função do tempo de reação. A figura 13 tipifica um cromatograma obtido na quantificação dos açúcares presentes na reação de produção de FOS.

Os rendimentos mais elevados da reação de produção de oligossacarídeos relatados na literatura têm variado entre 50 e 60% (p/p) (Sangeetha et al., 2004a; Hayashi et al., 2000, Fernández et al., 2004; Cruz et al., 1998; Park & Pastore, 2006). Yun & Song (1993) e Sheu et al. (1998) utilizaram glicose oxidase no meio de reação e obtiveram, respectivamente, rendimentos de 91 e 93% de FOS. Porém, o cálculo feito por esses autores não considera a quantidade de glicose consumida no meio de reação e, portanto não há um balanço de massa entre a quantidade de açúcares no início e no final da reação, sendo esses valores, portanto, superestimados e não comparáveis com os valores obtidos sem o emprego da enzima glicose oxidase.

Tabela 13: Perfil dos açúcares consumidos e/ou produzidos pela reação de síntese de FOS pela frutossiltransferase de *Penicillium* sp.

Açúcar (g/L)/Tempo (h)	0	6	12	24	48	72
GF	500,00	342,42	247,09	158,99	81,51	54,96
G	0,00	39,18	77,41	112,30	159,35	187,92
F	0,00	7,13	11,94	7,53	10,60	18,69
GF ₂	0,00	108,39	162,81	210,39	221,21	199,24
GF ₃	0,00	2,88	0,75	2,11	19,84	31,05
GF ₄	0,00	0,00	0,00	8,67	7,49	8,13
FOS	0,00	111,27	163,56	221,18	248,54	238,43

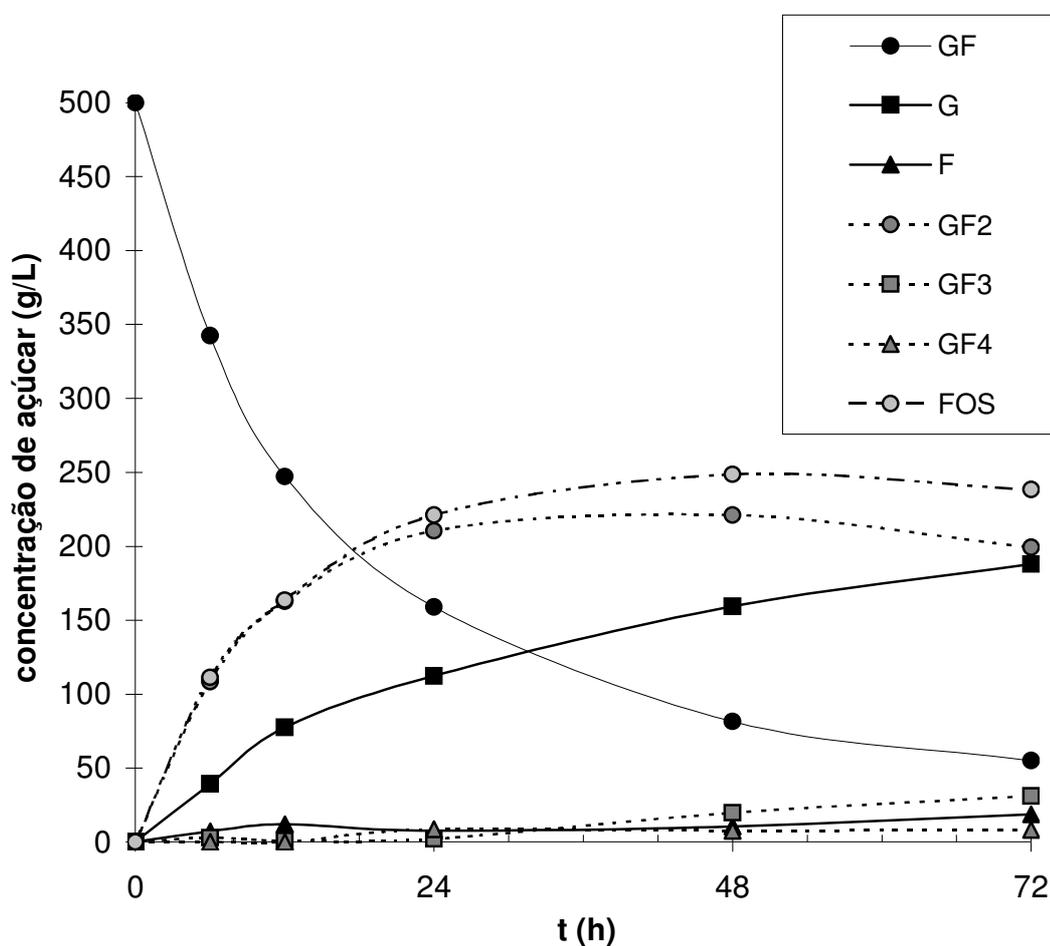


Figura 12: Cinética reacional da síntese de FOS pela FTase de *Penicillium* sp.

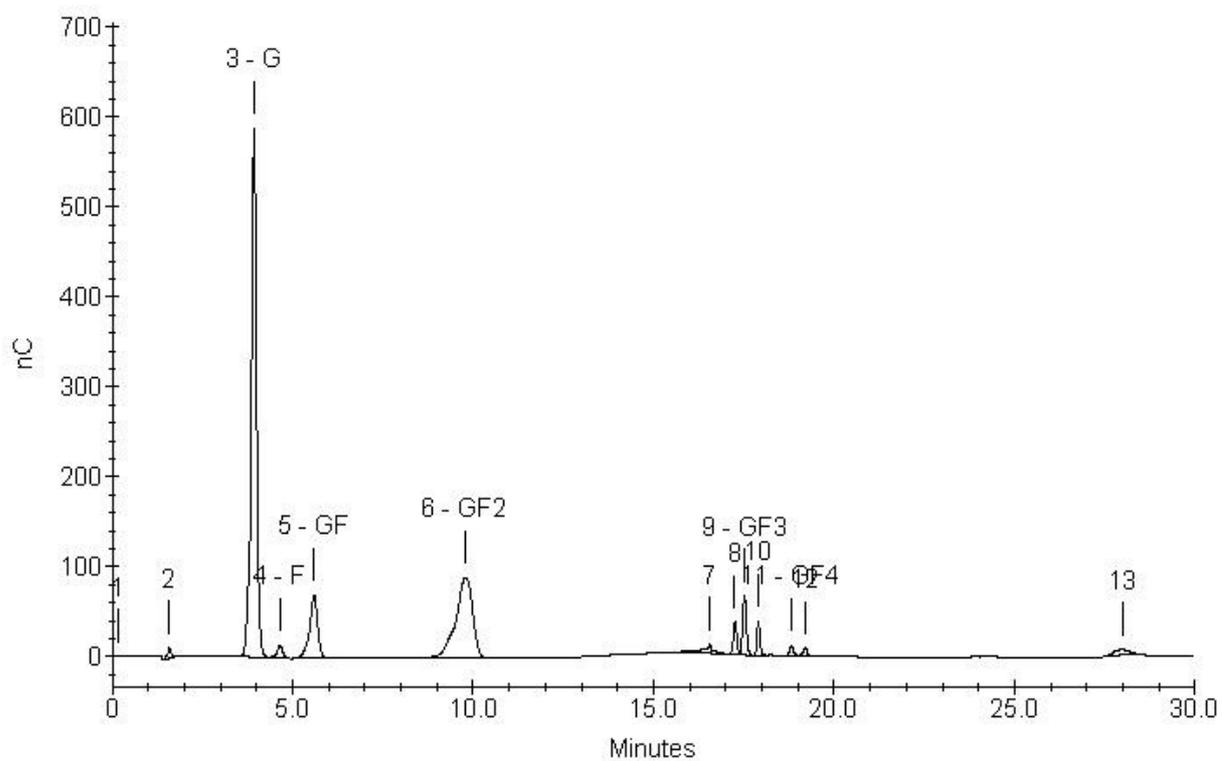


Figura 13: Cromatograma da reação de síntese de FOS pela FTase de *Penicillium* sp no tempo 48 horas

5. CONCLUSÕES

A linhagem LBAPD18, identificada como do gênero *Penicillium*, se mostrou potencial produtora da enzima frutossiltransferase. O estudo do efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de sacarose na atividade enzimática sugere que essa FTase apresenta atividade ótima em uma faixa estreita de pH (4,8 a 5,2) e temperatura (54 a 57 °C), porém em uma faixa mais ampla de concentração de sacarose (410 a 520 g/L).

A análise da meia vida da FTase mostra que temperaturas acima de 50 °C podem afetar rapidamente sua estabilidade térmica, entretanto, são necessários mais pontos experimentais para o ajuste do modelo matemático que descreve a cinética de meia vida.

O estudo do efeito da concentração de substrato na cinética enzimática da FTase indica que essa enzima não se adapta ao modelo matemático proposto por Michaelis & Menten, mas apresenta uma inibição pelo substrato a partir de uma dada concentração de sacarose, a qual não foi possível calcular por se tratar de parâmetros cinéticos calculados por meio de ajustes matemáticos gerados por poucos pontos experimentais.

A enzima FTase de *Penicillium* sp. atingiu o maior rendimento de FOS com 48 h de reação, sendo de aproximadamente 50% (p/p). Levando-se em consideração que esse valor foi obtido em condições não otimizadas para a produção da enzima e para a reação de síntese de FOS, pode-se dizer que foi um rendimento alto, quando comparado aos relatados na literatura, em que os maiores valores têm variado aproximadamente entre 50 e 60% (p/p).

Assim, os resultados experimentais indicam que a FTase de *Penicillium* sp. tem potencial para ser aplicada industrialmente, sendo necessários, contudo, maiores estudos buscando a otimização da produção da enzima pelo microrganismo e da reação de síntese de FOS. Posteriormente torna-se necessário estudar o aumento de escala para a produção de FOS, permitindo assim o uso industrial da mesma.

Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Estudar a produção da enzima FTase por *Penicillium* sp., visando à otimização das condições.
- ✓ Avaliar a produção da FTase em meios de cultivo constituídos por resíduos agroindustriais, tais como manipueira e melaço, reduzindo assim os custos com o processo.
- ✓ Otimizar as condições da reação de síntese de FOS para a FTase de *Penicillium* sp., aumentando assim consideravelmente o rendimento de FOS.
- ✓ Estudar a cinética de produção de FOS em um período de tempo maior, chegando a 96 h de reação.
- ✓ Avaliar o efeito do substrato na cinética enzimática utilizando mais valores da concentração de sacarose.
- ✓ Construir um modelo adequado à cinética da enzima.
- ✓ Estudar a imobilização da enzima FTase em diferentes suportes, escolhendo um ou mais que mantenham maior atividade de transfrutoseilação e por mais tempo.
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a FTase imobilizada, comparando assim com os resultados obtidos para a enzima livre.
- ✓ Estudar o aumento de escala da síntese de FOS gradativamente, visto ser essa uma enzima com potencial para aplicação industrial devido ao seu bom rendimento.
- ✓ Executar estudos sobre a purificação da FTase de *Penicillium* sp. e posteriormente caracterizá-la molecularmente quanto ao seu peso molecular e possivelmente sua estrutura tridimensional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahrens SKE & Schrezenmeir J (2002) Inulin, oligofructose and mineral metabolism-experimental data and mechanism. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 179-186.
2. Alvarado MB (2008) Estudo da cinética de síntese de oligossacarídeos pela enzima frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. Tese de Doutorado em andamento, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
3. Arrieta JG, Sotolongo M, Menéndez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramírez R & Hernández L (2004) A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 186(15), 5031-5039.
4. Bergeron LJ, Morou-Bermudez E, Burne RA (2000) Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3649-3654.
5. Bornet FR (1994) Undigestible sugars in food products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 763-769.
6. Bouhnik Y, Flourié B, Riottot M, Bisetti N, Gailing MF, Guibert A, Bornet F & Rambaud JC (1996) Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutrition and Cancer*, 26(1), 21-29.
7. Chambert R & Gonzy-Tréboul G (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *European Journal of Biochemistry*, 62(1), 55-64.
8. Chambert R, Treboul G & Dedonder R (1974) Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41(2), 285-300.

9. Chockchaisawasdee S, Athanasopoulos VI, Niranjana K & Rastall RA (2005) Synthesis of Galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: studies on Membrane-Fitted Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(4), 434-443.
10. Crittenden RG & Playne MJ (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7(11), 353-361.
11. Cruz R et al. (1998) Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. *Bioresource Technology*. v.65, p.139-143.
12. Delzenne NM, Daubioul C, Neyrinck A, Lasa M & Taper HS (2002) Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: reviews of biochemical events and future prospects. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 255-259.
13. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Borner F, Fern EB & Roberfroid MB (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1), 1-27.
14. Dixon M & Webb EC (1979) *Enzymes*, 3rd Ed, Academic Press, New York, 1116p.
15. Doran PM (2002) *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, New York, 439p.
16. Dorta C, Cruz R, Oliva-Neto P, Moura DJC (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the Fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 1003-1009.
17. Downes FP & Ito K (2001) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th Ed, American Public Health Association, Washington, 676 p.
18. Duan KJ, Chen JS, Sheu, DC (1994) Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, v.16, p.334-339.

19. FAO/WHO (2001) Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Food and Agriculture Organization of United Nations, World Health Organization, Córdoba, Argentina.
20. Fernández RC et al. (2004) Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v.79, p.268-272.
21. Fishbein L, Kaplan M, Gough M (1998) Fructooligosaccharides: a review In: Passos LML & Park YK Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. Ciência Rural. v.33, p.385-390.
22. Ghazi I, Fernandez-Arrojo L, Garcia-Arellano H, Ferrer M, Ballesteros A & Plou FJ (2006) Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. Journal of Biotechnology, 128(1), 204-211.
23. Ghazi I, Fernandez-Arrojo L, Segura AG, Alcade M, Plou FJ & Ballesteros A (2006) Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 2964-2968.
24. Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. The Journal of Nutrition, 125(6), 1401-1412.
25. Han JS, Park KJ, Shin DS, Kim JH, Kim JC, Lee KC, Lee WH, Kim SW, Park SW, inventors; CJ Corporation, assignee. 2007 Jul. 10. Microorganism producing fructosyl transferase and method for producing fructooligosaccharides and neofructooligosaccharides using the same. U.S. patent 7,241,607.
26. Hartemink R, Vanlaere KMJ & Rombouts FM (1997) Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 83(3), 367-374.

27. Hayashi S, Yoshiyama T, Fujii N & Shinohara S (2000) Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters*, 22(18), 1465-1469.
28. Hernalsteens S (2006) Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
29. Hernández L, Arrieta J, Betancourt L, Falcón V, Madrazo J, Coego A & Menéndez A (1999) Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current Microbiology*, 39, 146-152.
30. Hernandez L, Arrieta J, Menendez C, Vazquez R, Coego A, Suarez V, Selman G, Petit-Glatron MF & Chambert R (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *The Biochemical Journal*, 309(1), 113-118.
31. Hettwer U, Gross M & Rudolph K (1995) Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, 177(10), 2834-2839.
32. Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T & Tashiro Y (1986) Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora*. v.5, p.37-50.
33. Izzo M, Niness KR (2001) Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose In: Passos LML & Park YK Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*. v.33, p.385-390.
34. Kaufhold J, Hammon HM & Blum JW (2000) Fructooligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine, Animal Physiology, Pathology and Clinical Medicine*, 47(1), 17-29.
35. Kim BW, Kwon HJ, Park HY, Nam SW, Park JP, Yun JW (2000) Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Bioprocess Engineering*, 23 (1), pp. 11-16.

36. Kwak N & Jukes DJ (2001) Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12(2), 99-107.
37. Lim JS, Lee JH, Kang SW, Park SW & Kim SW (2007) Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. *European Food Research and Technology*, 225 (3-4), 457-462.
38. Martínez-Fleites C, Ortíz-Lombardía M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernández L & Davies GJ (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *The Biochemical Journal*, 390(1), 19-27.
39. Maugeri F & Hernalsteens S (2007) Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *Journal of Molecular Catalysis*. v. 49, p. 43-49.
40. Menrad, K (2003) Market and marketing of functional foods in Europe. *Journal of Food Engineering*. v.56, p.181-188.
41. Modler HW (1994) Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*, 4(5), 383-407.
42. Molis C, Flourié B, Ouarne F, Gailing MF, Lartigue S, Guibert A, Bornet F & Galmiche JP (1996) Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), 324-328.
43. Monsan P & Paul F (1995) Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(2-3), 187-192.
44. Nakakuki T (2002) Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure and Applied Chemistry*, 74(7), 1245-1251.
45. Nature's Sunshine Products. Disponível na Internet <http://www.optimumhealth.co.uk/PRODUCTS/children.htm>. Capturado em 05 de novembro de 2008.

46. Ohta A, Ozakabe N, Yamada K, Saito Y & Hidaka H (1993) Effects of fructooligosaccharides and other saccharides on Ca, Mg and P absorption in rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 46(2), 123-129.
47. Ohta A, Baba S, Takizawa T & Adashi T (1994) Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium in the magnesium-deficient rats model. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 40, 171-181.
48. Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Adashi T, Sakata T & Sakaguti E (1995a) Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *The Journal of Nutrition*, 125, 2417-2424.
49. Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adashi T & Kimura S. (1995b) Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 41, 281-291.
50. Oliveira EA (2007) Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de frutooligossacarídeos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
51. Oliveira IMA (1997) Produção e caracterização da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
52. Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC & Dijkhuizen L (2006) The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), 1187-1196.
53. Park MC, Lim JS, Kim JC, Park SW & Kim SW (2005) Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters*. v.27, p.127-130.
54. Park YK & Almeida MM (1991) Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(3), 331-334.

55. Park YK, Pastore GM, inventors; Usina da Barra S/A - Açúcar e Álcool, assignee. 2006 Jun 20. Process for preparing beta-fructofuranosidase enzyme and a process for producing fructooligosaccharides. U.S. patent 7,063,976.
56. Passos LML & Park YK (2003) Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*. v.33, p.385-390.
57. Petrini O (1991) Fungal endophyte of tree leaves In: Andrews J & Hirano SS *Microbial ecology of leaves*, New York, Springer Verlag, p.179-197.
58. Pool-Zobel B, van Loo J, Rowland I & Roberfroid MB (2002) Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 273-281.
59. Puupponen-Pimiä R, Aura AM, Oksmancaudentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sanholm T & Poutanen K (2002) Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1), 3-11.
60. Roberfroid MB, Gibson GR & Delzenne N (1993) Biochemistry of oligofructose, a non-digestible fructo-oligosaccharide: an approach to estimate its caloric value. *Nutritional Reviews*, 51, 137-146.
61. Rozen R, Bachrach G & Steinberg D (2004) Effects of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. *Carbohydrates Research*, 339, 2883-2888.
62. Sakai K, Aramaki K, Takasaki M, Inaba H, Tokunaga T & Ohta A (2001) Effect of Dietary Short-Chain Fructooligosaccharides on the Cecal Microflora in Gastrectomized Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(2), 264-269.
63. Sanders ME (2003) Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61(3), 91-99.
64. Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG (2004a) Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and

Aureobasidium pullulans CFR 77. Applied Microbiology and Biotechnology. v.65, p.530-537.

65. Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG (2004b) Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. Applied Microbiology and Biotechnology. v.65, p.530-537.
66. Sangeetha PT, Ramesh MN & Prapulla SG (2005a) Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. Process Biochemistry, 40(3-4), 1085-1088.
67. Sangeetha PT, Ramesh MN & Prapulla SG (2005b) Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. Trends in Food Science & Technology, 16(10), 442-457.
68. Santos AMP e Maugeri F (2007) Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. Food Technology and Biotechnology, 45(2), 181-186.
69. Shemesh M, Tam A, Feldman M & Steinberg D (2006) Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *fff*, *gtf* and *vicR* genes in presence of dietary carbohydrates et early and late exponential growth phases. Carbohydrate Research, 341, 2090-2097.
70. Sheu DC, Lio PJ, Chen ST, Lin CT & Duan KJ (2001) Production of fructooligosaccharides in high yield used a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. Biotechnology Letters, 23, 1499-1503.
71. Shin HT, Baig SY, Lee SW, Suh DS, Kwon ST, Lim YB & Lee JH (2004) Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. Bioresource Technology, 93, 59-62.
72. Song DD & Jacques NA (1999) Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. The Biochemical Journal, 341(2), 285-291.

73. Song KB, Joo HK & Rhee SK (1993) Nucleotide sequence of levansucrase gene (*lev U*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1173(3), 320-324.
74. Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Belém Pinheiro ML, Sarquis MIM & Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isoladas de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2), 185-195.
75. Spiegel JE, Rose R, Karabell P, Frankos VH & Schmitt DF (1994) Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology*, 48(1), 85-89.
76. Strickling JA, Harmon DL, Dawson KA & Gross KL (2000) Evaluation of oligosaccharides addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Animal Feed Science and Technology*. v.86, p.205-219.
77. Támara Y, Hormaza JV, Pérez C, León A, Arrieta J & Hernández L (1999) Structural analysis and optimized production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* STR4. *Biotechnology Letters*. v.21, p.117-121.
78. Tomomatsu H (1994) Health effects of oligosaccharides In: Passos LML & Park YK *Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos*. *Ciência Rural*, v.33, p.385-390.
79. Trujillo LE, Arrieta JG, Dafhnis F, García J, Valdéz J, Tambara Y, Pérez M & Hernandez L (2001) Fructo-oligosaccharides production by *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 139-144.
80. van Hijum SAFT, Szalowska E, van der Maarel MJEC & Dijkhuizen L (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 150(3), 621-630.
81. Wang X & Gibson GR (1993) Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(4), 373-380.

82. Wolf BW, Firkins JL & Zhang X (1998) Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. *Nutrition Research*, 18(10), 1791-1806.
83. Yamashita K, Kawai K & Itakamura M (1984) Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutrition Research*, 4(6), 961-966.
84. Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S & Yamaguchi H (1999) In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(1), 13-18.
85. Yun JW (1996) Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzymes and Microbial Technology*, 19(2), 107-117.
86. Yun, JW & Song SK (1993) The production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*. v.15 (6), p.573-576.