



PRISCILA HOFFMANN CARVALHO

**“CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE E
TREALULOSE UTILIZANDO-SE CÉLULAS DE *Serratia
plymuthica* ATCC 15928 LIVRES E IMOBILIZADAS EM
DIFERENTES MATRIZES COM ADIÇÃO DE
TRANSGLUTAMINASE”**

**Campinas
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRISCILA HOFFMANN CARVALHO

**“CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE E
TREALULOSE UTILIZANDO-SE CÉLULAS DE *Serratia plymuthica*
ATCC 15928 LIVRES E IMOBILIZADAS EM DIFERENTES
MATRIZES COM ADIÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE”**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciência de Alimentos.*

Orientadora: Hélia Harumi Sato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILA HOFFMANN CARVALHO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. HÉLIA HARUMI SATO
Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

C253c Carvalho, Priscila Hoffmann, 1983-
Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando-se células de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 livres e imobilizadas em diferentes matrizes com adição de transglutaminase / Priscila Hoffmann Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Hélia Harumi Sato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Imobilização. 2. Transglutaminase. 3. Isomaltulose. 4. *Serratia plymuthica*. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Conversion of isomaltulose and trehalulose from sucrose by *Serratia plymuthica* cells free and immobilised using transglutaminase

Palavras-chave em inglês:

Immobilization

Transglutaminase

Isomaltulose

Serratia plymuthica

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato [Orientador]

Ana Lúcia Leite Moraes

Luciana Ferracini dos Santos

Gabriela Alves Macedo

Fátima Aparecida Almeida Costa

Data de defesa: 18-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Profa. Dra Ana Lúcia Leite Moraes
Membro Titular
Universidade Federal de Alfnas

Profa. Dra Luciana Ferracini dos Santos
Membro Titular
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras

Profa. Dra Gabriela Alves Macedo
Membro Titular
FEA / UNICAMP

Profa. Dra Fátima Aparecida Almeida Costa
Membro Titular
FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Raimundo Grosso
Membro Suplente
FEA / UNICAMP

Dr. Haroldo Yukio Kawaguti
Membro Suplente
Pesquisador

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Membro Suplente
Universidade de Brasília

Necessitamos uns dos outros para sermos nós mesmos.

(Santo Agostinho)

Ao meu esposo Eduardo Rosa

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em toda caminhada, acadêmica e na vida pessoal ao me deparar com algo maior que eu ou que me parecia sem solução, Deus com seus mimos sempre me mostrou uma pessoa, um amigo, um conhecido e até mesmo um desconhecido que se mostrava experiente naquilo que era minha limitação com disponibilidade essa pessoa me orientava, com isso o caminhar tem sido tranquilo.

Embora consciente de que faltarão nomes, quero listar as pessoas a quem sou eternamente grata e oferecer esse trabalho concluído com um sincero abraço como expressão de gratidão.

A graça de Deus que me conduz com amor.

Ao meu amado esposo Eduardo, super pai dos meus filhos, meu melhor amigo agradeço por me acompanhar e ajudar nos experimentos fora do horário comercial, por me questionar quando era preciso e sempre incentivar.

Aos meus filhos Mariana e Danilo por colocarem em minha vida simplicidade, cores e beleza.

Aos amigos e conselheiros Pedro, Aline, Beá, Vânia Battestin, Marise, Guilherme, Diana e Renata.

À amiga Maria Josiane, sem sua ajuda esse trabalho não aconteceria.

Aos meus queridos bolsistas Josinha, Diani, Kelly, Nicolle, Jéssica e Rafael.

Aos professores Profa Hélia, Prof Carlos Grosso e Haroldo, pela disponibilidade e orientação.

Aos colegas sempre dispostos a ajudar Talita Almeida, Rodrigo Catharino, Fifa, Yara e Ruann, Fabíola, Profa Hilary, Prof Pedro Felício, Profa Mirna.

Ao pessoal no Laboratório de Bioquímica Bia, Val, Nadir, Dora, Iramaia, Marcela, Fabíola, Luciana Malta, Profa Gabriela e Prof. Park.

Ao pessoal do LEB que me acolheu com carinho Fifa, Prof. Francisco Maugeri, Profa. Bel, Prof. Andreas, Cris, Dani, Suzan, Mariano, Marcos, Lais e Felipe

Aos meus alunos no Senac e na FAJ, assim como os queridos Isael e Lílian.

Aos meus amigos que me sustentam com suas orações Carolina, Rafaela, Dulce, Emiliana, Leandrinho, Pe. Norberto, Pe. Edemilson, Guilherme, Marise.

Aos meus pais Carmen e Beto e irmã Thaís, cunhados Elis, Matraca, Renato e Thiago, sobrinhos Leonardo e Aline e meus sogros. Horácio, Maria José e também meus tios Leila, Isael, Nerci e Lourdes, pois a família é a maior expressão do amor no mundo.

Um agradecimento especial a minha irmã Thassia por estar sempre atenta e presente junto a mim e as crianças.

Resumo

A isomaltulose e a trealulose são dissacarídeos isômeros estruturais, que podem ser obtidos a partir da sacarose utilizando-se glicosiltransferase bacteriana. Esses dissacarídeos são considerados açúcares alternativos de grande potencial para uso nas indústrias de alimentos e farmacêutica porque são hidrolisados e absorvidos mais lentamente e apresentam baixo potencial cariogênico comparado com a sacarose.

Foi estudada a imobilização de células de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, produtora de glicosiltransferase por gelificação iônica em gel alginato contendo transglutaminase (TG) e também a utilização de células livres para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.

Utilizando-se células livres de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi obtido 70% de conversão em isomaltulose e 8% de trealulose a 25°C por 10 bateladas de 15 minutos, a partir de solução de sacarose 30%.

Entre as cinco amostras de alginato de sódio testadas, para a imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 com e sem adição de TG, foram obtidos melhores resultados (médio de três bateladas) de conversão de sacarose (37,4% de isomaltulose) utilizando o alginato de sódio B, de alta viscosidade (14.000cP Sigma – A 7128) em presença de TG. Nas condições estudadas (1,7% de alginato de sódio, 30% de massa celular úmida, solução de cloreto de sódio 0,2Mol/L, 2%

de TG e 35% de sacarose) também houve maior facilidade de formação de grânulos uniformes. A presença de TG como agente de reticulação na matriz de imobilização melhorou a estabilidade de conversão por três bateladas onde observou-se resultado médio 27% maior com relação a matriz com o mesmo tipo de alginato (B) em ausência de TG.

A composição da matriz de imobilização com adição de TG foi otimizada por metodologia de planejamento experimental, assim como a adição de gelatina como fonte de proteína adicional para promoção de ligações cruzadas catalisadas pela TG. Os melhores resultados de conversão de sacarose (solução 35%) em isomaltulose (72,66% de isomaltulose e 8% de trealulose em 4 bateladas de 24 horas) foram obtidos utilizando-se matriz de polissacarídeo-proteína composto de 1,7% de alginato de sódio 14.000cP (Sigma®-A7128), 0,25mol/L de CaCl₂, 0,5% de gelatina, 3,5% de TG e concentração de massa celular úmida superior a 35% (m:v).

Verificou-se que a adição de ALMP na matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG para imobilização de *S. plymuthica*, testada por planejamentos experimentais seqüenciais, não aumentou a estabilidade da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose quando comparada com as células imobilizadas em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG.

Em processo contínuo utilizando-se coluna empacotada com células de *S. plymuthica* imobilizadas em matriz otimizada e descrita acima, foi obtida taxa de conversão média de 64% de sacarose em isomaltulose durante 200 horas de

processo, equivalente a 0,27g de isomaltulose/g de células imobilizadas/hora em coluna a 25°C e fluxo de substrato (35% de sacarose) 0,2mL/min.

Palavras Chave: Imobilização, transglutaminase, isomaltulose, *Serratia plymuthica*.

ABSTRACT

The isomaltulose and trehalulose are disaccharides and structural isomers, which can be obtained from sucrose using bacterial glycosyltransferase. These disaccharide are considered alternative sugars with great potential for use in the food and pharmaceutical industries because they are hydrolyzed and absorbed more slowly and have a low cariogenic potential compared with sucrose.

The conversion of sucrose to isomaltulose and trehalulose was studied using immobilized and free cells of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. The cells were immobilized by ionic gelation in alginate gel containing transglutaminase.

Using free cells of *Serratia plymuthica* ATCC 15928 was obtained 70% isomaltulose conversion and 8% trehalulose conversion at 25° C in 10 batches of 15 minutes from a 30% sucrose solution.

Among the five samples of sodium alginate tested for *S. plymuthica* ATCC 15928 cells immobilization, with or without the addition of TG, the best results (average of three batches) were obtained using sodium alginate B, high viscosity (14.000cP Sigma - A 7128) in the presence of TG, leading to 37.4% isomaltulose conversion from sucrose. In the studied conditions (1.7% sodium alginate, 30% wet cell mass solution of sodium chloride 0.2 Mol/L, 2% TG, 35% sucrose) was also easier to form uniform granules. The presence of TG as a crosslinking agent in the immobilization matrix improved the stability during three batches, resulting in an

27% higher average conversion with respect to a same type of alginate (B) matrix in absence of TG.

Immobilization matrix compositions with addition of TG was optimized by experimental design methodology, as well as the addition of gelatin as a protein source for promoting additional crosslinking catalyzed by TG. The best results conversion of sucrose (35% solution) into isomaltulose (72.66% of isomaltulose and 8% of trehalulose in 4 batches of 24 hours) were obtained using protein-polysaccharide matrix composed of 1.7% alginate 14.000cP sodium (Sigma[®] A7128), 0.25 Mol/L CaCl₂, 0.5% gelatin, 3.5% TG, and wet cell mass concentration of 35% (w:v).

It has been found that the addition of ALMP (amidated low methoxyl pectin) into the calcium alginate-gelatin-TG matrix for immobilization of *S. plymuthica*, tested by sequential experimental design, do not increase the stability of sucrose to isomaltulose conversions rate when compared with cells immobilized in calcium alginate -gelatin-TG matrix.

In continuous process using a packed column with *S. plymuthica* cell's immobilized in the optimized matrix described above, it was obtained an average conversion rate of 64% sucrose to isomaltulose during a 200 hours process, equivalent to 0.27g isomaltulose per gram of immobilized cell per hour, in a column at 25° C and using flow substrate (35% sucrose) of 0.2 mL / min.

Keywords: Immobilization, transglutaminase, isomaltulose, *Serratia plymuthica*.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1	Isomaltulose e Trealulose	6
2.2	Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por sacarose isomerase ou glicosiltransferase microbiana.	12
2.3	Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas.....	15
2.3.1	Imobilização em alginato de cálcio	17
2.3.2	Interação polissacarídeo e proteína.....	19
2.3.3	Gelatina	20
2.3.4	Transglutaminase	21
2.3.5	<i>Pectina de baixo teor de metoxilação amidada</i>	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Manutenção do micro-organismo.....	27
3.2	Conversão de sacarose em isomaltulose e outros carboidratos por células livres de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 produtora de glicosiltransferase. .	27
3.2.1	Conversão de açúcar cristal em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos pelas células livres de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928.	27

3.2.1.1	Análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência	29
3.2.2	Estudo dos efeitos da concentração de substrato e temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> por planejamento experimental completo DCCR 2 ² e confirmação por ensaios em duplicata.	30
3.2.3	Estudo da taxa de reuso das células livres de <i>S. plymuthica</i> para conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos. ...	31
3.3	Estudo da imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 para a conversão de sacarose em isomaltulose	32
3.3.1	Efeito do tipo de alginato de sódio e da adição de transglutaminase na imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> e na conversão de sacarose em isomaltulose.	32
3.3.2	Otimização da imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG em processo de batelada para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	34
3.3.2.1	Planejamento fatorial fracionado 2 ⁵⁻¹ para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato de sódio, gelatina, transglutaminase e CaCl ₂ na matriz de imobilização de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	35
3.3.2.2	Delineamento composto central rotacional DCCR-2 ³ para estudo dos efeitos da concentração de alginato de sódio, transglutaminase e CaCl ₂	

na matriz de imobilização de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	37
3.3.2.3 Delineamento composto central rotacional DCCR-2 ² para estudo dos efeitos da concentração de transglutaminase e massa celular na matriz de alginato de cálcio para imobilização de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.....	38
3.3.3 Estudo da imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em matriz de pectina de baixo teor de metoxilação amidada, alginato de cálcio, transglutaminase e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.....	39
3.3.3.1 Caracterização da pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP)	39
3.3.3.2 Otimização das condições de imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em matriz de pectina de baixo teor de metoxilação amidada, alginato de sódio, transglutaminase e gelatina em processo de batelada para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	39
3.3.3.2.1 Estudo dos efeitos de ALMP, massa celular, alginato de sódio, gelatina, transglutaminase e CaCl ₂ na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por planejamento experimental PB-12.....	40

3.3.3.2.2	Estudo dos efeitos de ALMP, alginato de sódio e gelatina na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por planejamento experimental DCCR-2 ³ .	41
3.3.3.2.3	Testes em triplicatas das melhores concentrações de alginato de sódio ALMP, gelatina, transglutaminase e CaCl ₂ obtidas nos dois ensaios anteriores para a imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.....	43
3.3.4	Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de alginato-gelatina-TG em processo contínuo, utilizando coluna de leito empacotado.	44
3.3.4.1	Imobilização celular.....	44
3.3.4.2	Efeito da temperatura e do fluxo de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando-se células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 imobilizadas em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG, em processo contínuo utilizando-se colunas empacotadas...	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Conversão de sacarose em isomaltulose e outros carboidratos por células livres de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 produtora de glicosiltransferase. .	47
4.1.1	Conversão de açúcar cristal em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos por células livres de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928.....	47
4.1.2	Estudo dos efeitos da concentração de substrato e temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i>	

por planejamento experimental DCCR 2 ² e confirmação por ensaio em duplicata.....	49
4.1.3 Estudo da taxa de reuso das células livres de <i>S. plymuthica</i> para conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos. ..	57
4.2 Estudo da imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 para conversão de sacarose em isomaltulose.....	59
4.2.1 Efeito do tipo de alginato e da adição de transglutaminase na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> e na conversão de sacarose em isomaltulose.....	59
4.2.2 Otimização das condições de imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em matriz de alginato de cálcio-gelatina com adição de TG, em processo de bateladas, para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.....	65
4.2.2.1 Planejamento fatorial fracionado 2 ⁵⁻¹ para estudo dos efeitos das concentrações de MC, alginato de sódio, gelatina, TG, e CaCl ₂ na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	66
4.2.2.2 Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ³ para estudo dos efeitos do alginato, TG e CaCl ₂ na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.....	73

4.2.2.3	Delineamento composto central rotacional DCCR 2 ² para estudo do efeito da concentração de TG e MC na imobilização de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose.....	82
4.2.3	Estudo da imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em matriz de alginato de cálcio, pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP), TG e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose	91
4.2.3.1	Caracterização da pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP)	91
4.2.3.2	Otimização das condições de imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em matriz de alginato de sódio, ALMP, TG e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose em processo por bateladas.	92
4.2.3.2.1	Estudo dos efeitos das variáveis alginato, MC, gelatina, ALMP, CaCl ₂ , TG na imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> por metodologia de planejamento experimental Plakett-Burman-12 (PB-12).	92
4.2.3.3	Estudo dos efeitos das variáveis alginato, gelatina, ALMP na imobilização de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por metodologia de planejamento experimental por delineamento composto central rotacional completo- DCCR 2 ³	101
4.2.3.4	Testes em triplicatas das melhores concentrações de alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl ₂ obtidas nos dois ensaios anteriores	

para a imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose.....	109
4.2.4 Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em alginato com gelatina e TG em processo contínuo, utilizando coluna de leito empacotado.....	116
5 CONCLUSÕES	127
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
7 ANEXOS	145
7.1 Estudo do efeito da concentração de proteínas (autoclavada ou não) e da TG na imobilização e estabilidade das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose.	145
7.1.1 MATERIAL E MÉTODOS	145
7.1.1.1 Efeito da concentração de gelatina e de caseína (autoclavada ou não) na imobilização e estabilidade das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em alginato de cálcio com TG e conversão de sacarose em isomaltulose.....	145
7.1.1.1.1 Determinação de açúcares redutores	147
7.1.1.2 Estudo do efeito da concentração da gelatina (autoclavada ou não) e TG na imobilização e estabilidade das células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose.....	148

7.1.1.3	Caracterização da gelatina e alginato de sódio quanto ao potencial zeta	149
7.1.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	150
7.1.2.1	Efeito da concentração de gelatina e de caseína e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio com TG.	150
7.1.2.2	Efeito da concentração de gelatina e TG e da etapa de autoclavagem da solução de gelatina na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio.	154
7.1.2.3	Caracterização da gelatina e alginato de sódio quanto ao potencial zeta	156

Índice de Figuras

Figura 1. Formação de ligações covalentes cruzadas intermoleculares entre resíduos de lisina e glutamina de proteínas pela ação da transglutaminase.....	22
Figura 2. Produção de isomaltulose, a partir de sacarose, por células de <i>S. plymuthica</i> imobilizadas em colunas de leito empacotado.....	46
Figura 3. Cromatograma dos açúcares isomaltulose, trealulose, glicose e frutose formados a partir de sacarose utilizando-se células de <i>S. plymuthica</i> ATCC 15928 produtoras de glicosiltransferase.....	48
Figura 4. Superfície de resposta e curva de contorno da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em função da concentração de substrato sacarose e da temperatura em processo em batelada	53
Figura 5. Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em função da concentração de substrato sacarose e da temperatura: Ensaio (a) 40% de sacarose, 25°C; Ensaio (b) 30% de sacarose, 30°C; Ensaio (c) 40% de sacarose, 30°C.....	56
Figura 6. Conversão de solução 30% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose, a 25°C em condições otimizadas utilizando-se células livres de <i>S. plymuthica</i>	57

Figura 7. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de <i>S. plymuthica</i> imobilizadas em diferentes marcas de alginato de sódio sem adição da enzima TG.....	61
Figura 8. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de <i>S. plymuthica</i> imobilizadas em diferentes marcas de alginato de sódio com adição da enzima TG.....	61
Figura 9. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 20 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} durante seis bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	69
Figura 10. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 20 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	70
Figura 11. Conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> dos 18 ensaios do segundo planejamento experimental DCCR-2 ³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 e TG na imobilização celular.....	76

Figura 12. Valores médios das quatro bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose dos 18 ensaios do planejamento experimental DCCR-2 ³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl ₂ e TG na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	77
Figura 13. Superfície de resposta e curva de contorno dos efeitos do CaCl ₂ , alginato de sódio e TG na imobilização de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2 ³)	81
Figura 14. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 12 ensaios do planejamento experimental DCCR-2 ² para estudo dos efeitos da concentração de massa celular e transglutaminase na imobilização de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio.....	85
Figura 15. Conversão média entre as 4 bateladas de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 12 ensaios do planejamento experimental DCCR-2 ² para estudo dos efeitos da concentração de massa celular e da TG na imobilização de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio.....	86
Figura 16. Superfície de resposta e curva de contorno dos efeitos das variáveis concentração de massa celular e da TG na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio e conversão da sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2 ²).....	89

Figura 17. Conversão de sacarose em isomaltulose obtida nos 16 ensaios do planejamento PB– 12 durante cinco bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	96
Figura 18. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 16 ensaios do planejamento Plackett-Burman – 12 para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de <i>S. plymuthica</i> por 5 bateladas de 24h.....	97
Figura 19. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose obtidos nos 18 ensaios do planejamento DCCR 2 ³ durante quatro bateladas de 24 horas, para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, alginato e gelatina na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	104
Figura 20. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 18 ensaios do planejamento DCCR-2 ³ para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	105
Figura 21. Superfície de resposta dos efeitos da concentração de alginato de sódio, ALMP e gelatina na imobilização de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2 ³)	108

Figura 22. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 7 ensaios em triplicata durante quatro bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas, e TG na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	112
Figura 23. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 7 ensaios em triplicata, durante quatro bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP não autoclavada, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas e TG na imobilização de <i>S. plymuthica</i>	115
Figura 24. Grânulos de células de <i>S. plymuthica</i> imobilizadas dispostas em colunas de leito empacotado.....	117
Figura 25. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C e fluxo de substrato de 0,3mL/min (Coluna 1).....	118
Figura 26. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,2mL/min (Coluna 2)	119

Figura 27. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,5mL/min (Coluna 3)	120
Figura 28. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,65mL/min (Coluna 4).....	121
Figura 29. Conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 27°C com fluxo de substrato de 0,3mL/min (Coluna 5).....	122
Figura 30. Conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>Serratia plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 27°C com fluxo de substrato de 0,2mL/min (Coluna 6).....	123
Figura 31. Estudo do efeito da concentração de caseína e gelatina e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio e TG, na conversão de sacarose em açúcares redutores, durante três bateladas de 24 horas.....	153

Figura 32. Estudo do efeito da concentração gelatina e TG e da etapa de autoclavagem da solução de gelatina na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em açúcares redutores durante três bateladas de 24 horas.....	156
--	-----

Índice de Tabelas

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^2 codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) para estudo dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em processo em batelada	50
Tabela 2. Efeitos principais e interações dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura (DCCR- 2^2) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em processo em batelada.....	51
Tabela 3. Coeficientes de regressão, desvios padrão, <i>t</i> e <i>p</i> dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura do DCCR- 2^2 para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em processo em batelada.....	52
Tabela 4. Análise de variância dos resultados dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura (DCCR- 2^2) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em processo em batelada....	53
Tabela 5. Ensaios para o estudo dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato sacarose (30 e 40%) e da temperatura (25-30°C) na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de <i>S. plymuthica</i> em processo em batelada.....	54

Tabela 6. Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos ensaios A, B e C do estudo dos efeitos da concentração de substrato (30 e 40%) e da temperatura (25 e 30°C) utilizando-se células livres de *S. plymuthica*55

Tabela 7. Porcentagem de isomaltulose e desvio padrão utilizando células de *S. plymuthica* imobilizadas em diferentes tipos de alginato (A,B,C,D e E): (a) sem adição da enzima TG (b) com adição da enzima TG.....63

Tabela 8. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} para a otimização da composição da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.....66

Tabela 9. Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato de sódio, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 e na conversão de sacarose em isomaltulose por processo em bateladas (24h).....67

Tabela 10. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante seis bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos nos 20 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica*...68

Tabela 11. Resultados dos efeitos, desvio padrão e limites de confiança do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} da conversão de sacarose em isomaltulose estudado por seis bateladas (a, b, c, d, e, f) de 24 horas individualmente.....71

Tabela 12. Valores decodificados dos níveis utilizados para as variáveis do planejamento experimental DCCR-2³ para a otimização dos componentes da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.....73

Tabela 13. Planejamento experimental DCCR-2³ codificado para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, cloreto de cálcio e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.....75

Tabela 14. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas.....78

Tabela 15. Análise de variância do segundo planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24h.....79

Tabela 16. Valores da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose experimentais e previstas pelo modelo e desvios para o planejamento experimental DCCR-2³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização de células *S. plymuthica*80

Tabela 17. Valores decodificados dos níveis utilizados para as variáveis MC e TG do planejamento experimental (DCCR-2²) para a otimização da imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.....83

Tabela 18. Planejamento experimental DCCR-2² codificado para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas.....84

Tabela 19. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental (DCCR-2²) para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* com alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas.....86

Tabela 20. Análise de variância do planejamento experimental (DCCR-2²) para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas87

Tabela 21. Valores (média de 4 bateladas) da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento experimental DCCR-2² para o estudo dos efeitos das variáveis concentração de massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.....88

Tabela 22. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis MC, alginato, gelatina, ALMP, CaCl₂, TG do planejamento experimental Plackett-Burman–12 para a otimização da composição da matriz de imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose93

Tabela 23. Planejamento Plackett-Burman – 12 codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de MC, alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl₂ na imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose94

Tabela 24. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante cinco bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos nos 16 ensaios do planejamento Plackett-Burman – 12 para estudo do efeito da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl₂ na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.....95

Tabela 25. Resultados dos efeitos, desvio padrão e limites de confiança do planejamento fatorial Plackett-Burman-12 para estudo dos efeitos da concentração de MC, alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl₂ na imobilização de *S.*

plymuthica e conversão de sacarose em isomaltulose estudado por cinco
bateladas (a, b, c, d, e) de 24 horas individualmente98

Tabela 26. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis alginato de
sódio, ALMP e gelatina no planejamento experimental DCCR 2³ para a otimização
da composição da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928
e conversão de sacarose em isomaltulose.....101

Tabela 27. Planejamento DCCR 2³ codificado com as combinações experimentais
para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, gelatina e ALMP na
imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose
em isomaltulose por processo em bateladas (24h).....102

Tabela 28. Porcentagem de conversão de solução 35% de sacarose em
isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos
nos 18 ensaios do planejamento DCCR 2³ para estudo do efeito da concentração
de ALMP, alginato e gelatina na imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC
15928.....103

Tabela 29 Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de
confiança do planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos da
concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de células de *S.*
plymuthica106

Tabela 30. Análise de variância do planejamento experimental (DCCR-2 ³) para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de células de <i>S. plymuthica</i>	107
Tabela 31. Concentrações de alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e cloreto de cálcio utilizados nos sete ensaios do estudo univariável para a imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> e conversão de sacarose em isomaltulose.....	109
Tabela 32. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas, conversão média das quatro bateladas, conversão média das triplicatas em cada ensaio e desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas dos 7 ensaios para estudo univariável do efeito da concentração de ALMP, alginato, gelatina, CaCl ₂ em soluções autoclavadas, e TG na imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> (A, B e C são as triplicatas de cada um dos sete ensaios).....	111
Tabela 33. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas, conversão média das quatro bateladas, conversão média das triplicatas em cada ensaio e desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas dos 7 ensaios para estudo univariável do efeito da concentração de ALMP não autoclavada, alginato, gelatina, CaCl ₂ em soluções autoclavadas e TG na imobilização de células de <i>S. plymuthica</i> (A, B e C são as triplicatas de cada um dos sete ensaios)	114

Tabela 34. Médias das taxas de conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de <i>S. plymuthica</i> em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em colunas de leito empacotado, em processo contínuo por 200 horas.....	125
Tabela 35. Parâmetros utilizados no estudo dos efeitos da adição de caseína ou gelatina e da etapa de autoclavagem no processo de imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio e TG.....	147
Tabela 36. Parâmetros utilizados no estudo da determinação dos efeitos da concentração de gelatina (autoclavada ou não) e TG no processo de imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio	149
Tabela 37. Média dos resultados dos açúcares redutores da primeira à terceira batelada dos ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose para estudo do efeito da concentração de caseína ou gelatina e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio com TG.....	152
Tabela 38. Média dos açúcares redutores da primeira à terceira batelada de conversão de sacarose em isomaltulose para estudo do efeito da concentração de gelatina (autoclavada ou não) e TG na imobilização das células de <i>S. plymuthica</i> em alginato de cálcio.....	155

Lista de Abreviaturas

TG – Transglutaminase

ALMP – Pectina de baixo teor de metoxilação amidada

MC – Massa celular

M/G – poli ác. manurônico/poli ác. gulurônico

DCCR – Delineamento composto central rotacional

PB – Plackett-Burman

1 INTRODUÇÃO

A isomaltulose e a trealulose são isômeros estruturais da sacarose. A isomaltulose, também conhecida como palatinose[®], ocorre naturalmente no mel e na cana-de-açúcar e tem sido considerada um promissor adoçante substituto da sacarose (NAGAI-MIYATA, *et al.* 1993). A isomaltulose é usada no Japão como ingrediente e substituto da sacarose na produção de gomas de mascar, produtos lácteos e de panificação, doces, chocolates, sobremesas e bebidas, devido ao seu baixo potencial cariogênico. A isomaltulose apresenta cerca de 50% da doçura da sacarose e propriedades físicas e sensoriais muito similares (HUANG, *et al.* 1998) e, quando utilizada em alimentos, como substituto da sacarose em confeitos e chocolates, não foram notadas diferenças na doçura ou sabor residual (TAKAZOE, 1989).

A trealulose, que possui cerca de 70% da doçura da sacarose e baixo potencial cariogênico, pode ser utilizada em alimentos com altos teores de adoçantes como geléias e balas de goma (SALVUCCI, 2003).

A isomaltulose e a trealulose apresentam baixa velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, e conseqüentemente possuem baixos índices glicêmicos e uma menor resposta à requisição de insulina; sendo, portanto, recomendados para aplicação em alimentos e bebidas destinados aos diabéticos e esportistas (ARAI, *et al.* 2007; KRASTANOV & YOSHIDA, 2003;

RAVAUD, *et al.* 2005). Comercialmente a isomaltulose é utilizada, pela indústria de alimentos, na produção de isomalte, uma mistura equimolar de açúcar-álcool de baixo valor calórico e não cariogênico, obtido por hidrogenação.

A isomaltulose possui valor de mercado maior do que a sacarose. A conversão de sacarose em isomaltulose e posterior hidrogenação química deste último para a produção de isomalte é, portanto, bastante atrativa e promissora (LICHTENTHALER, 2006).

A isomaltulose e a trealulose são obtidos simultaneamente através da conversão enzimática da sacarose, pela enzima glicosiltransferase, produzida por micro-organismos. No entanto a proporção dos produtos de conversão varia conforme a linhagem. As glicosiltransferases das linhagens de *Protaminobacter rubrum* (HASHIMOTO, *et al.* 1987), *Erwinia rhapontici* NCPPB1578 (CHEETAM, 1984; SALVUCCI, 2003), *Erwinia sp.* (KAWAGUTI & SATO, 2010a) *Serratia plymuthica* ATCC 15928 (VERONESE & PERLOT, 1999; KAWAGUTI & SATO 2010b), *Pantoea dispersa* UQ68J (Wu & BIRCH, 2004); *Klebsiella sp.* (HUANG, *et al.* 1998), convertem a sacarose em isomaltulose (50 – 90%), enquanto que as enzimas de *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (RAVAUD *et al.*, 2005) e *Agrobacterium radiobacter* MX-232 produzem principalmente trealulose (cerca de 90%) (NAGAI-MIYATA, *et al.* 1993).

O alginato de sódio é o suporte mais utilizado para a imobilização de células microbianas inteiras. Recentemente, alguns trabalhos relataram o uso de transglutaminase (TG) para a imobilização de células e enzimas (WANG *et al.*,

2008; PARTANEN *et al.*, 2009). A transglutaminase é uma enzima microbiana que catalisa a formação de ligações cruzadas entre proteínas por formação de ligação entre grupo γ carboxila da glutamina e o grupo ϵ amino da lisina.

A imobilização de células e enzimas em suportes insolúveis tem sido amplamente estudada e apresenta inúmeras vantagens incluindo reutilização e ou separação rápida da célula ou enzima do meio de reação (WANG, 2007).

Muitas técnicas têm sido propostas para imobilização de células e enzimas incluindo adsorção, encapsulação e estratégias de ligação covalente. A imobilização realizada por ligação covalente gera matrizes mais robustas que apresentam alta resistência a variação de temperatura e agentes desnaturantes. Entretanto alguns reagentes químicos utilizados como agentes de ligação cruzada podem inativar enzimas, e a aplicação pode não ser indicada para o processamento de alimentos. Com isso a TG se apresenta como uma alternativa interessante a ser aplicada como agente de ligação cruzada por agir em condições brandas, não agredir as enzimas e células preservando sua atividade e evitando o uso de agentes químicos tóxicos (WANG, 2007).

A capacidade da transglutaminase em formar ligações covalentes cruzadas intra e intermoleculares tanto a 50°C (temperatura ótima de atividade) como a 5°C permite a formação de rede protéica útil para a imobilização de enzimas e células (MACEDO, 2005).

Pectina de baixo teor de metoxilação (ALMP) apresenta capacidade de formação de gel em presença de íons cálcio e demonstra potencial para aplicação em imobilização celular, visto que, para essa matriz podem ser aplicadas as mesmas metodologias utilizadas com o alginato (MARUDOVA & JILOV, 2003).

A aplicação de ALMP foi estudada por SANDOVAL-CASTILLA e colaboradores (2010) como matriz alternativa de microencapsulação de *L. casei* para adição em bebida láctea como probiótico.

Este trabalho teve como objetivo estudar a conversão enzimática da sacarose (açúcar cristal) em isomaltulose e trealulose empregando-se células livres e imobilizadas da bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928, produtora de glicosiltransferase visando a estabilidade das altas taxas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose em processo em batelada e contínuo. Foi estudado a composição da matriz de imobilização da bactéria *S. plymuthica* por gelificação iônica em alginato.

A enzima transglutaminase foi aplicada na composição da matriz de imobilização como agente de reticulação visando aumentar a retenção da bactéria *S. plymuthica* e promover estabilidade de conversão de sacarose em isomaltulose em processo por bateladas e contínuo.

Foram estudados os efeitos de diferentes tipos de alginato e da adição da enzima TG na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Foram estudados os efeitos das variáveis concentração de alginato de sódio, cloreto de cálcio, gelatina, enzima TG e massa celular, por metodologia de planejamento experimental, na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Foi estudado o efeito da adição de pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP) na matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG para a imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose, por planejamento experimental.

As células de *S. plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TG, em condições otimizadas foram testadas em sistema contínuo, em coluna empacotada, para a conversão de sacarose (açúcar cristal) em isomaltulose e trealulose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Isomaltulose e Trealulose

Nos últimos anos a indústria de alimentos tem incentivado e explorado a preferência dos consumidores por produtos mais saudáveis e com menor conteúdo calórico. Com isso observa-se também aumento na demanda de novos substitutos da sacarose devido aos efeitos prejudiciais desse açúcar na saúde humana, relacionados ao ganho de peso e obesidade, elevação da taxa de colesterol e outros efeitos adversos como cáries dentárias e diabetes (LOO, *et al.* 1999; VERONESE & PERLOT, 1998).

A sacarose é o dissacarídeo mais abundante no mundo. É essencialmente produzido por plantas, onde desempenha papel vital como carboidrato de transporte e por vezes de armazenamento. Quimicamente a sacarose é um dissacarídeo não redutor, devido a sua ligação α 1 $\rightarrow$ 2 entre a glicose e a frutose. Os isômeros da sacarose podem ocorrer naturalmente ou serem formados a partir da atividade de glicosiltransferases ou sacarose isomerases. Os isômeros da sacarose envolvem a ligação glicosídica entre o carbono anomérico da glicose e os carbonos não anoméricos da frutose resultando em cinco dissacarídeos redutores que apresentam propriedades químicas individuais, sobre as quais, em algumas aplicações, se sobressaem com vantagem à sacarose. Os isômeros

leucrose (α 1 $\rightarrow$ 5), maltulose (α 1 $\rightarrow$ 4), turanose (α 1 $\rightarrow$ 3) são ocasionalmente formados como produtos secundários da síntese de poliglucanas ou reações de hidrólise de amido. Alguns micro-organismos podem converter sacarose com rendimentos notáveis em isômeros estruturais isomaltulose (α 1-6) e trealulose (α 1-1) (GOULTER, 2012).

A sacarose (O- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-frutofuranosídeo) pode ser convertida enzimaticamente nos isômeros isomaltulose (O- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -frutofuranose) e trealulose (O- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 1)- β -frutopiranosil) (KRASTANOV & YOSHIDA, 2003). A isomaltulose, ocorre naturalmente no mel e na cana-de-açúcar em pequenas quantidades e tem sido considerado um promissor adoçante substituto da sacarose (MOYNIHAN, 1998). A isomaltulose é usada como ingrediente e substituto da sacarose na produção de gomas de mascar, produtos lácteos e de panificação, doces, chocolates, sobremesas e bebidas, devido ao seu baixo potencial cariogênico (HUANG, *et al.* 1998). Presente no mercado japonês desde 1985, o açúcar isomaltulose sob nome comercial Palatinose[®], teve sua comercialização aprovada nos Estados Unidos, União Européia, Austrália e Nova Zelândia (RAVAUD, *et al.* 2009). A isomaltulose apresenta baixa velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, e conseqüentemente possuem baixos índices glicêmicos e uma menor resposta à requisição de insulina; sendo, portanto, recomendados para aplicação em alimentos e bebidas destinados aos diabéticos e esportistas (ARAI, *et al.* 2007; KRASTANOV & YOSHIDA, 2003; RAVAUD, *et al.* 2005).

Estudos indicam que a isomaltulose e seu derivado obtido por hidrogenação, o isomalte, atuam como inibidores das glicosidases do intestino. Foi observada a inibição de hidrólise de sacarose, maltose, dextrina e amido quando em mistura equimolar com a isomaltulose. A isomaltulose é citada como um substituto promissor da sacarose por possuir melhores propriedades físico-químicas e vantagens funcionais em relação à sacarose (LINA, *et al.* 2002).

A isomaltulose apresenta cerca de 50% da doçura da sacarose (HASHIMOTO, *et al.* 1987; SHIMIZU, *et al.* 1982; HUANG, *et al.* 1998) e propriedades físicas e sensoriais muito similares (TSUYUKI, *et al.* 1992) e, quando utilizada em alimentos, como substituto da sacarose em confeitos e chocolates, não foram notadas diferenças na doçura ou sabor residual (TAKAZOE, 1989).

Comercialmente a isomaltulose é utilizada, na indústria de alimentos, na produção de isomalte, uma mistura equimolar de açúcar-álcool de baixo valor calórico e não cariogênico, obtida por hidrogenação. O isomalte também conhecido como Isomalt® e Palatinit® tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua aplicação industrial como substituto da sacarose em processamento de alimentos sendo utilizado como adoçante dietético e não cariogênico (DUFLOT & FOUACHE, 2001; MAKI, *et al.* 1983; OOSHIMA, *et al.* 1983).

Alguns micro-organismos produzem sacarose isomerases ou glicosiltransferases que convertem a sacarose nos dissacarídeos redutores isomaltulose e trealulose. No entanto a proporção dos produtos de conversão varia conforme a linhagem, com formação de glicose e frutose como subprodutos.

A taxa de produção depende principalmente da linhagem bacteriana utilizada, mas também da temperatura, pH e condições de reação. (HUANG, *et al.* 1998; VERONESE & PERLOT, 1998). As glicosiltransferases das linhagens de *Protaminobacter rubrum* (HASHIMOTO, *et al.* 1987; KAKINUMA, *et al.* 1998; SARKKI, *et al.* 1999; OLIVA-NETO & MENÃO, 2009), *Erwinia carotovora* (LUND & WYATT, 1973), *Erwinia rhapontici* NCPPB1578 (CHEETHAM, 1984; SALVUCCI, 2003), *Erwinia* sp. D12 (KAWAGUTI, *et al.* 2006; KAWAGUTI & SATO 2010b), *Serratia plymuthica* (VÉRONÈSE, 1999; KRASTANOV & YOSHIDA, 2003; MCALLISTER, *et al.* 1990; ORSI, 2008; KAWAGUTI & SATO, 2010a), *Pantoea dispersa* UQ68J (WU & BIRCH, 2005), *Klebsiella* sp. (PARK, *et al.* 1992; PARK, *et al.* 1996), *K. planticola* (HUANG *et al.*, 1998), convertem a sacarose principalmente em isomaltulose (50-90%) (WU & BIRCH, 2004), as enzimas de *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (RAVAUD *et al.*, 2005) e de *Agrobacterium radiobacter* MX-232 produzem principalmente trealulose (cerca de 90%) (NAGAI-MIYATA, *et al.* 1993).

O mercado voltado para a produção do isomaltulose, também conhecida como Palatinose® ou Lylose® é bastante promissor, e possui atualmente um valor equivalente a 2 Euros/Kg, contra um valor de 0,20 Euros/Kg referente à sacarose, sendo assim, um produto de maior valor agregado (LICHTENTHALER, 2006). O mercado voltado para o isomalte também é promissor, sendo atualmente um produto que possui alto valor agregado e que é produzido e comercializado em escala industrial por um número reduzido de países, como o Japão e a Alemanha.

A trealulose possui cerca de 70% da doçura da sacarose e baixo potencial cariogênico podendo ser utilizada em alimentos com altos teores de açúcares como geleias e balas de goma (OOSHIMA, *et al.* 1991; SALVUCCI, 2003).

Isomaltulose pode ser obtida na forma de pó branco e cristalino. É termoestável (ponto de fusão a 122°C) inclusive em soluções ácidas e apresenta baixa higroscopicidade e doçura de aproximadamente 42% em relação à sacarose (HASHIMOTO *et al.* 1987)

Estudos em ratos e porcos indicam que o açúcar isomaltulose é completamente hidrolisado e absorvido no intestino delgado, entretanto a taxa de hidrólise é muito menor se comparada a sacarose. Isomaltulose é particularmente adequada para inclusão em produtos dietéticos (LINA, *et al.* 2002). Pode ser aplicada na obtenção de oligômeros de isomaltulose, que atuam como prebióticos, estimulando a proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal (KASHIMURA, *et al.* 1996).

A isomaltulose é um carboidrato que é hidrolisado lentamente no intestino e é totalmente absorvida no intestino delgado, porém em taxas menores que a sacarose, resultando em menores picos de glicemia e liberação de glicose mais duradoura, com isso requer também menor resposta de insulina (LINA, *et al.* 2002).

HOLUB e colaboradores (2010) publicaram o primeiro estudo investigativo da digestibilidade e absorção de isomaltulose, *in vivo* em humanos saudáveis

submetidos à dieta contendo isomaltulose acompanhados por 4 semanas. Os resultados confirmam que a hidrólise da isomaltulose é completa, mas é muito lenta assim como a sua absorção no intestino delgado humano, com isso não promove a formação de altos picos glicêmicos, confirmando a isomaltulose como um açúcar de baixa caloria e baixa requisição de insulina.

Os efeitos da ingestão de carboidratos na resposta de glicemia no sangue depende do tipo de carboidrato ingerido. Em 2003, WESNES sugeriu que a redução da atenção e memória em crianças que receberam cereais com diferentes carboidratos, incluindo isomaltulose, foi menor que a observada em crianças que receberam glicose em bebida. Como os carboidratos complexos são digeridos mais lentamente isso pode contribuir para retardar a liberação de glicose no sangue e consecutivamente manter os níveis constantes o que por sua vez pode influenciar no desempenho (BENTON & JARVIS, 2007).

TAIB, *et al.* (2012) relataram que a ingestão de isomaltulose por adultos aumenta a habilidade em cálculos na mesma intensidade que a sacarose após 90 min da ingestão, porém essa habilidade cai mais lentamente com isomaltulose. Em crianças de 5 a 6 anos foi observada redução do declínio no desempenho cognitivo (atenção, índice de sensibilidade e memória de trabalho numérico) para aquelas que ingeriram leite enriquecido com isomaltulose no café da manhã em comparação com leite adicionado de glicose.

2.2 Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por sacarose isomerase ou glicosiltransferase microbiana.

Em 1990, MCALLISTER e colaboradores relataram o primeiro estudo da utilização de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 como produtora de glicosiltransferase intracelular capaz de converter sacarose em isomaltulose. A glicosiltransferase foi extraída e purificada apresentando conversão de solução de sacarose 40% em isomaltulose com eficiência de 87%. A *Serratia plymuthica* é um micro-organismo gram negativo da família *Enterobacteriaceae*, mesófilo, anaeróbio facultativo.

VÉRONÈSE & PERLOT (1999) obtiveram 72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% de frutose e 10,1% de glicose, a partir de solução 292 mM de sacarose utilizando glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, após 5 horas de reação a 30°C e verificaram que a enzima apresentou atividade ótima em pH 6,2. A produção máxima de isomaltulose foi verificada a 30°C.

No trabalho de KRASTANOV & YOSHIDA (2003) 1 g de células úmidas de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi misturada com uma amostra de 10 mL de solução de sacarose 40% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 37°C. Após 2 horas de reação, praticamente toda a sacarose foi convertida em 79,9% de isomaltulose, 7,0% de trealulose, 5,84% de frutose, 2,90% de glicose e 2,79% de outros açúcares.

KRASTANOV, e colaboradores (2006) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *S. plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em quitosana com o aditivo glutaraldeído, em reator por batelada e contínuo. Foram testadas diferentes concentrações de substrato sacarose (30-70%) e concluiu-se que concentrações superiores a 50% de sacarose dificulta a conversão em isomaltulose. A melhor condição foi 30% de sacarose atingindo conversão superior a 90% de isomaltulose. Em processo contínuo o melhor resultado foi de 94% de isomaltulose a partir de sacarose 40%. A determinação qualitativa e quantitativa dos açúcares foi feita por HPLC equipado com coluna de análise de carboidratos e detector RI 401.

Posteriormente o autor e colaboradores (2007), estudaram a conversão de solução 40% de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase de células de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em *hollow-fiber* e obtiveram taxa de conversão de sacarose em isomaltulose de 90% por 36 a 48 horas.

ORSI (2008) estudou a otimização dos componentes do meio de cultivo para a obtenção de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 com alta atividade de glicosiltransferase. Utilizando-se o meio de cultivo otimizado composto de 40g/L de melaço de cana de açúcar, 15g/L de peptona bacteriológica Biobrás® e 20g/L de extrato de levedura Prodex LAC foi obtida atividade de glicosiltransferase de 25,97U/mL.

A autora estudou a conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* e obteve média de conversão de 75,2% durante 9

bateladas sucessivas de reuso das células. Verificou-se que a faixa de pH ótimo da glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* para conversão de sacarose em isomaltulose situou-se entre 6,0 e 7,0 e a temperatura ótima da fermentação pela bactéria foi de 26°C. Utilizando coluna empacotada contendo células de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em goma gelana tratadas com glutaraldeído e secas por 36h a 10°C, obteve 69% de conversão de sacarose em isomaltulose durante 15 dias. Para células imobilizadas em alginato de cálcio, foi obtida taxa de conversão de 64% de isomaltulose durante 15 dias, a 25°C. Os açúcares foram analisados em cromatógrafo líquido Dionex® equipado com coluna carbo Pac PA1™ (4 mm X 270 mm) e detector eletroquímico ED50.

Bactérias produtoras de sacarose isomerases são usadas industrialmente para conversão de sacarose em seus isômeros, particularmente isomaltulose e trealulose, que apresentam vantagens sobre a sacarose para a aplicação em alimentos. As sacarose isomerases podem converter sacarose em solução em seus isômeros sem a necessidade de cofatores e a conversão pode ser consideravelmente completa devido a baixa energia para a obtenção dos múltiplos isômeros (GOULTER, 2012).

A sacarose isomerase purificada de *Erwinia rhapontici* NX-5, converteu sacarose em isomaltulose com taxas superiores 80%, em trealulose (13,8%) e traços de glicose e frutose (< 1%) (REN, 2011).

A glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em celite 545 apresentou conversão de sacarose em isomaltulose em taxas superiores a 60%.

Foi testada a imobilização das células em microcápsulas de pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP) e gordura (manteiga e ácido oléico). As microcápsulas de ALMP e gordura que foram liofilizadas apresentaram conversão de sacarose em isomaltulose superior a 60% enquanto as microcápsulas não liofilizadas apresentaram conversão de 30% de sacarose na primeira batelada (CONTESINI *et al.*, 2012)

OLIVA-NETO & MENÃO (2009) estudaram a conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase de células de *Protaminobacter rubrum* imobilizadas em alginato de cálcio, glutaraldeído e polietilenimina. Foi obtido entre 84 e 94% de conversão enzimática de sacarose em isomaltulose em pH 7,0 e 30°C.

A produção industrial de trealulose foi estudada por NAGAI e colaboradores (2003) utilizando-se células de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 imobilizadas em alginato de cálcio com polietilenimina e glutaraldeído. Foi obtida taxa de conversão de 83% de trealulose a partir de solução de 40% de sacarose.

2.3 Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas.

A imobilização é um processo que gera partículas capazes de confinar compostos ativos em uma matriz permitindo sua reutilização em mais de uma vez

(VELINGS & MESTDAGH, 1994), por meio de processo simples de separação como a filtração.

A imobilização oferece outras vantagens como minimização do processo de purificação, possibilidade de processo contínuo, reutilização de células ou enzimas. Sendo assim o avanço em processos bioquímicos contínuos podem ser atribuídos ao advento dos processos de imobilização (XI & XU, 2005). A imobilização de células em matrizes de hidrogel pode oferecer proteção às condições severas do meio extracelular como pH, temperatura, solvente orgânico e outros compostos capazes de inativar as células (DERVAKOS & WEBB 1991).

O sucesso do material de imobilização é freqüentemente medido em termos da extensão com a qual esse material restringe a difusão de vários solutos como proteínas, açúcares e sais dentro e fora do gel (AMSDEN & TURNER, 1999)

A produção industrial de isomaltulose somente apresenta viabilidade econômica quando são utilizadas células imobilizadas de bactérias como *S. plymuthica*, *Erwinia* sp., *Klebsiella* sp. produtoras de glicosiltransferase capazes de converter sacarose em isomaltulose. Há poucos relatos de aplicação de preparações de glicosiltransferase para a conversão de sacarose em isomaltulose devido ao alto custo da enzima e baixa estabilidade térmica. Muitos estudos estão sendo aplicados para a melhoria e desenvolvimento de tecnologia de imobilização celular.

A imobilização em alginato de cálcio para a produção de isomaltulose tem sido aplicada devido ao tamanho relativamente pequeno da molécula de sacarose que facilmente penetra na estrutura (OLIVA-NETO & MENÃO, 2009), e também devido as condições brandas necessárias para a imobilização celular.

Os sistemas de imobilização podem oferecer resistências difusionais que podem afetar negativamente a biotransformação. A difusão do substrato é um parâmetro importante no caso de conversão de sacarose devido a alta viscosidade da solução. Vários fatores como concentração, viscosidade e tipo de alginato, concentração de massa celular e tamanho da partícula final são importantes para a imobilização, tanto quanto o aprisionamento das células e difusão do substrato o que por sua vez determina o rendimento global (MUNDRA, *et al.* 2007).

2.3.1 Imobilização em alginato de cálcio

O alginato é um dos compostos mais usados para imobilização e encapsulação de células microbianas, enzimas, hormônios, fármacos, óleos e aromas (VELINGS & MESTDAGH, 1994).

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas e sua estrutura básica é composta de uma cadeia linear de polímeros contendo ácido- β -1,4-D-manurônico e resíduos de ácido- α -1,4-L-gulurônico, sendo capaz de formar gel

termicamente estável em presença de íons cálcio. Existem diferentes seqüências e composições destes monômeros nos vários tipos de alginato disponíveis que determinam as propriedades do gel formado. Os monômeros se apresentam em blocos nas cadeias de alginato. As regiões são referidas como blocos M de ácido manurônico e blocos G de ácido gulurônico. Os tipos diferentes de alginato são descritos pela proporção de ácido manurônico e ácido gulurônico em sua composição [M/G]. O alginato é usado por não apresentar toxicidade e por sua habilidade em formar hidrogéis em condições brandas (FUNDUEANU, 1999; AMSDEN & TURNER, 1999).

Usualmente o material a ser encapsulado é misturado em uma solução de alginato de sódio e a mistura é gotejada em outra solução contendo íons cálcio, resultando na formação instantânea de micropartículas onde estão encapsuladas células ou enzimas em estrutura tridimensional. As interações iônicas entre blocos de guluronato e íons cálcio causam a formação de gel forte e termoestável com propriedades que dependem amplamente das características do polímero e dos métodos de preparação. O sucesso desse método simples de encapsulação é devido as condições brandas necessárias e ao baixo custo de processo. (STORKER, *et al.* 1991).

2.3.2 Interação polissacarídeo e proteína

A aplicação de hidrocolóides utilizando-se interação entre polissacarídeo e proteína vem sendo estudada para a obtenção de cápsulas para a indústria farmacêutica e aplicações em produtos lácteos com e sem o uso da enzima transglutaminase (TG) (MATIA-MERINO, *et al.* 2004) e representa alternativa interessante para aplicação em imobilização de células.

A combinação das propriedades das proteínas e dos polissacarídeos sob condições apropriadas (concentração, proporção proteína:polissacarídeo, pH, força iônica e temperatura) pode ser uma boa estratégia para melhorar a estabilidade de emulsões (GUZEY e McCLEMENTS, 2006). De fato, proteínas e polissacarídeos podem formar complexos através de ligações covalentes ou interações de atração eletrostática.

A interação eletrostática em partículas pode ser controlada por variações de carga de superfície que podem ser determinadas pelo potencial zeta das partículas. Fatores como pH e concentração de eletrólitos em solução tem um forte impacto na força e no tipo de cargas eletrostáticas na superfície das partículas e assim pode levar a diferentes intensidades de adsorção de proteínas quando diferentes condições são utilizadas (PATIL *et al.*, 2007).

A agregação e adsorção entre proteínas e polissacarídeos com superfícies carregadas depende das características físico-químicas da superfície e pode

variar com o tipo e densidade da carga, conformação, orientação dos polímeros e o tempo de interação (ROACH, FARRAR & PERRY, 2005).

A interação entre polissacarídeos e proteínas, especificamente entre alginato-gelatina, pectina-gelatina e pectina-caseína tem sido estudada para a aplicação em produtos farmacêuticos visando a melhoria de características como coesão e elasticidade em cápsulas e microcápsulas (JOSEPH & VENKATRAM, 1995; SHINDE & NAGARSENKER, 2009). A utilização de matrizes mistas de polissacarídeo-proteína é uma alternativa possível para a imobilização de células, sem representar grandes alterações no protocolo do processo usualmente aplicado.

2.3.3 Gelatina

A gelatina é um dos materiais não sintéticos mais utilizados para a estabilização de substâncias lábeis como vitaminas, fármacos e enzimas (SCHACHT, *et al.* 1993; SUNGUR, *et al.* 1992). Geralmente substâncias sintéticas como glutaraldeído e formaldeído são utilizados como agentes de promoção de ligações cruzadas e manutenção da estabilidade do gel. Segundo FUCHSBAUER e colaboradores (1996) a gelatina, não apresenta toxicidade e é um bom substrato para a TG, sendo que filmes de gelatina formados com ligações cruzadas de TG apresentam boa elasticidade e resistência.

A gelatina é um produto obtido como resultado da hidrólise parcial do colágeno animal. É uma proteína de alta massa molecular, solúvel em água em temperaturas superiores a 30°C (POPPE, 1997) e apresenta-se gelificada quando submetida a resfriamento em temperaturas inferiores a 15°C. Para a obtenção da gelatina o colágeno é hidrolisado por fervura em presença de ácido (gelatina tipo a, $pI \sim 7-9$) ou álcali (gelatina tipo b, $pI \sim 5$) (TAHERIAN *et al.*, 2011).

A composição de aminoácidos da gelatina varia em função da fonte, mas apresentam grande quantidades dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, e não contém os aminoácidos triptofano e cisteína. A gelificação é uma das mais importantes propriedades da gelatina. Em termos moleculares, a gelificação da gelatina envolve a renaturação de estruturas, no estado desordenado, da gelatina para estruturas de tripla hélice, características do colágeno no estado nativo (ACHET & HE, 1995).

2.3.4 Transglutaminase

A transglutaminase é uma enzima microbiana que catalisa a formação de ligações cruzadas entre proteínas por formação de ligação entre grupo carboxila γ da glutamina e o grupo amino ϵ da lisina (SOARES, *et al.* 2003) (Figura 1).

KAMATA e colaboradores (1992) descreveram pela primeira vez que enzimas podiam ser imobilizadas de forma estável após adsorção física em suportes e tratamento subsequente com transglutaminase microbiana através da formação de ligações cruzadas.

A transglutaminase se apresenta como interessante agente de ligação cruzada, indicada como substituto de agentes de uso não permitido no processamento de alimentos. Deve-se considerar, também que em comparação com métodos químicos, a ligação cruzada catalisada pela transglutaminase requer condições brandas, permitindo imobilização de enzimas e micro-organismos lábeis (SYNOWIEKI & WOLOSOWSKA, 2006).

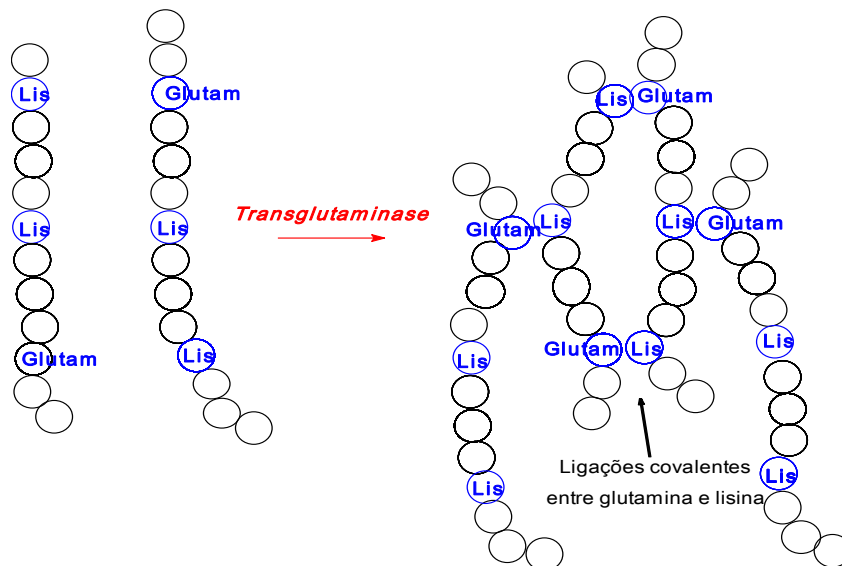


Figura 1. Formação de ligações covalentes cruzadas intermoleculares entre resíduos de lisina e glutamina de proteínas pela ação da transglutaminase.

A transglutaminase microbiana apresenta atividade ótima em pH 5 a 8 e estabilidade em ampla faixa de pH (4 a 9). A enzima apresenta atividade ótima a 28 – 47°C sendo que é ativa em baixas temperaturas (5-10°C) (MACEDO & SATO, 2005).

A transglutaminase produzida comercialmente pela Ajinomoto pode ser aplicada na união de pedaços de carne bovina, suína, peixe, frango etc, para a obtenção de peças inteiras de carne re-estruturada de diferentes formas e tamanhos. A enzima pode ser utilizada na formação de géis protéicos resistentes a tratamento térmico a partir de proteínas que não formam géis e também na formação de filmes protéicos. A capacidade da transglutaminase em formar ligações covalentes cruzadas intra e intermoleculares tanto a 50°C (temperatura ótima de atividade) como a 5°C permite a formação de rede protéica útil para a imobilização de enzimas e células (MACEDO, *et al.* 2005).

FUCHSBAUER e colaboradores (1996) estudaram a influência de matrizes de gelatina na formação de ligações cruzadas com transglutaminase nas propriedades da β -galactosidase imobilizada em filmes insolúveis de gelatina. Os autores verificaram que o procedimento de imobilização afetou ligeiramente o pH e a temperatura ótima de atividade da β -galactosidase.

KAWASHITA e colaboradores (2002) estudaram a imobilização da enzima cicloisomaltooligossacarídeo glucanotransferase em membranas de troca iônica do tipo *hollow fiber*, e conseguiram fixação em quantidade excepcionalmente alta, utilizando a transglutaminase.

Em produtos lácteos, tem sido observada a capacidade de atuação da TG nas micelas de caseína formando ligações cruzadas gerando micelas mais estáveis mesmo que sob diferentes tratamentos como refrigeração ou acidificação. As ligações cruzadas aumentam a força de ligação entre as micelas, com isso, geralmente os poros nas redes protéicas tornam-se menores melhorando a capacidade de retenção de água e estabilidade (PARTANEN, *et al.* 2008).

A transglutaminase microbiana tem sido utilizada para a imobilização de células e enzimas (WANG, *et al.* 2008; TOMINAGA, *et al.* 2006; SYNOWIEKI & WOLOSOWSKA, 2006).

TOMINAGA e colaboradores (2006) descreveram a imobilização específica de proteínas funcionais usando transglutaminase microbiana. Usando fosfatase alcalina como modelo, foi obtida uma fosfatase alcalina recombinante com um peptídeo curto (MKHKGS) no N-terminal da enzima para fornecer um resíduo de Lys ativo para a transglutaminase. Por outro lado foi utilizada a caseína, um substrato da transglutaminase, que foi ligada quimicamente a resina de poliacrilamida para fornecer resíduos de glutamina. Os autores imobilizaram a enzima recombinante à resina, utilizando a transglutaminase microbiana.

SYNOWIECKI & WOLOSOWSKA (2006) descreveram a imobilização de β -glucosidase de *Sulfolobus shibatae* em silica gel modificada com 3-aminopropiltrióxido por ligações cruzadas utilizando transglutaminase. Os resultados indicaram que a atividade da β -glicosidase aumentou em 33% quando imobilizada em silica gel modificada com 3-aminopropiltrióxido, entretanto essa mesma

matriz tratada com transglutaminase aumentou a estabilidade da enzima imobilizada em sílica gel e promoveu o aumento de 4 vezes na atividade enzimática. Esse resultado sugere que a participação das ligações covalentes catalisadas pela transglutaminase promove a ligação cruzada entre a enzima e a superfície do suporte. Os autores citaram que comparado com os métodos químicos, a utilização de transglutaminase para a formação de ligações cruzadas requer condições brandas que permitem a imobilização de enzimas lábeis. Além disso, a sua aplicação evita a contaminação da enzima imobilizada com resíduos de reagentes de acoplamento.

WANG e colaboradores (2008) imobilizaram uma α -amilase de *Bacillus licheniformis* em sílica revestida com filme de 1% de quitosana, 1% de caseína e 15U/mL de TG em pH 6,0 por 6h. Após a imobilização a enzima manteve mais do que 70% da atividade original após 20 reutilizações.

2.3.5 Pectina de baixo teor de metoxilação amidada

A aplicação de ALMP tem sido muito estudada na área farmacêutica como suporte para acondicionamento de vários tipos de fármacos e seus princípios ativos. As pesquisas de aplicação em alimentos estão relacionadas à sua capacidade de formação de gel estável e vantagens como ingrediente para várias formulações em alimentos (MARUDOVA & JILOV, 2003).

Pectina de baixo teor de metoxilação apresenta capacidade de formação de gel em presença de íons cálcio e demonstra potencial para aplicação em imobilização celular, visto que, para essa matriz podem ser aplicadas as mesmas metodologias utilizadas para o alginato. Recentemente a aplicação de ALMP foi estudada por SANDOVAL-CASTILLA e colaboradores (2010) como matriz alternativa de microencapsulação de *Lactobacillus casei* para adição em bebida láctea como probiótico. Foram estudadas matrizes de imobilização formadas por alginato, ALMP e misturas de alginato-ALMP proporções de 1:2, 1:4 e 1:6. Foram avaliados, diâmetro, esfericidade e propriedades de textura da matriz e eficiência de retenção do *L. casei*. Os resultados obtidos para retenção das células e propriedades de textura foram melhores para as matrizes compostas da mistura de alginato-ALMP, sendo que o alginato contribuiu significativamente para a esfericidade dos grânulos e a ALMP contribuiu positivamente com a estabilidade e resistência mecânica dos grânulos. Foi observado que quanto maior a concentração de pectina maior a dureza e resistência mecânica dos grânulos e isso implicou diretamente em maior capacidade de retenção das células. Segundo os autores, esse resultado indica as diferenças existentes entre as ligações cruzadas da rede polimérica formada no alginato de cálcio, pectato de cálcio e alginato-pectato de cálcio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção do micro-organismo

A bactéria *Serratia plymuthica* ATCC 15928, usada para a produção de glicosiltransferase e conversão de sacarose em isomaltulose, foi obtida na Fundação André Tosello – Campinas/SP/Brasil. A bactéria foi mantida em tubos inclinados de meio de cultura composto de 20g/L de sacarose, 40g/L de peptona, 4g/L de extrato de carne, 20g/L de ágar, sob refrigeração (8-10°C) com repicagem a cada dois meses.

3.2 Conversão de sacarose em isomaltulose e outros carboidratos por células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928 produtora de glicosiltransferase.

3.2.1 Conversão de açúcar cristal em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos pelas células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928.

A massa celular de *S. plymuthica* ATCC 15928 foi obtida por fermentação do micro-organismo em meio de cultivo otimizado por ORSI (2008). Para a

preparação do pré-inóculo uma alçada de cultura jovem do micro-organismo *S. plymuthica* foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250mL, contendo 50mL de meio de cultura otimizado composto por 40g/L de melaço de cana de açúcar, 15g/L de peptona bacteriológica e 20g/L de extrato de levedura. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA), a 150 rpm, a 30°C, por 12 horas. Uma alíquota de 300mL do pré-inóculo foi transferida para fermentador de 6,6L Bioflo IIC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) contendo 2.700mL de meio de cultura. A fermentação foi realizada durante 8 horas a 27°C mantendo-se a agitação e aeração a 200 rpm e 1 vvm respectivamente como descrito por KAWAGUTI e colaboradores (2006). O meio de cultivo foi centrifugado a 9.600 x g por 15 minutos (centrifuga Beckman J2-21, Beckman-Couter, Inc., Fullerton, CA, EUA) a 5°C, a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada.

Amostras de 3g de massa celular úmida foram ressuspensas em 27mL de solução de 35% de sacarose (açúcar cristal), na proporção 1:9. Para o preparo do substrato de 35% de sacarose, toda a vidraria e utensílios necessários foram autoclavados a 121°C por 15 min, assim como o tampão fosfato 0,005mol/L pH 6,5 utilizado na dissolução da sacarose. A sacarose foi dissolvida por agitação em solução tampão ainda quente (aproximadamente 100°C) após retirada da autoclave. Após resfriamento, à temperatura ambiente, a solução foi armazenada em refrigerador a 10°C por até 3 dias.

As suspensões celulares foram incubadas em frascos Erlenmeyers de 250mL a 35°C a 50 rpm em incubador-agitador durante 15 minutos e em seguida, centrifugadas a 9.600 x g a 5°C para separação da massa celular. Foram adicionadas novas amostras de 27 mL de soluções 35% de sacarose às massas celulares e as suspensões incubadas novamente como descrito acima. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi acompanhada como descrito a seguir no item 3.2.1.1.

3.2.1.1 Análise de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência

As análises dos carboidratos foram realizadas em cromatógrafo DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPacTM PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPacTM PA 1 (4 mm x 50 mm) e solução de hidróxido de sódio 250 mM como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, a 20°C. Os carboidratos foram analisados através do tempo de retenção, por comparação com padrões de frutose, glicose, sacarose e isomaltulose (Sigma Ultra[®], Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

3.2.2 Estudo dos efeitos da concentração de substrato e temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de *S. plymuthica* por planejamento experimental completo DCCR 2² e confirmação por ensaios em duplicata.

Para avaliar a o efeito da concentração de substrato e temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de *S. plymuthica* ATTC 15928 foi realizado um planejamento fatorial completo 2² (DCCR-2²) para avaliação de concentração de substrato (30 – 50%) e temperatura (25 – 30°C) com tempo de reação de 75 minutos.

Para a confirmação dos resultados de concentração de substrato e temperatura foram realizados três testes em duplicata, sendo o ensaio A a 40% de substrato sacarose a 25°C, o ensaio B a 30% de substrato sacarose e 25°C e ensaio C a 40% de substrato sacarose e 30°C. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL e mantidos em incubador sob agitação a 100 rpm. Cada frasco continha 5,25 g de massa celular úmida de *S. plymuthica* em 35 mL de substrato sacarose em tampão fosfato 0,005M, pH 6,5. As células livres de *Serratia plymuthica* foram reutilizadas por 7 bateladas de 15 minutos. Para a reutilização das células as suspensões de massa celular e sacarose em tampão fosfato foram centrifugadas a 9.600 x g a 5°C para separação da massa celular. Foram adicionadas novas amostras de 35 mL de soluções de sacarose às massas celulares e as suspensões incubadas novamente como descrito acima.

3.2.3 Estudo da taxa de reuso das células livres de *S. plymuthica* para conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos.

A taxa de reuso das células livres de *S. plymuthica* durante a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi testada nas condições otimizadas usando 30% de sacarose (açúcar cristal) e temperatura de 25°C. Frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 5,25g de massa celular úmida de *S. plymuthica* e 35mL de solução 30% de sacarose em tampão fosfato 0,005M pH 6,5 foram incubados a 25°C e 100 rpm por 15 minutos e as células foram reutilizadas durante 10 bateladas. A alteração da quantidade de massa celular úmida e do pH do meio de reação foram acompanhados durante as bateladas. Os açúcares redutores foram determinados como descrito no item 3.2.1.1.

3.3 Estudo da imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 para a conversão de sacarose em isomaltulose

3.3.1 Efeito do tipo de alginato de sódio e da adição de transglutaminase na imobilização de células de *S. plymuthica* e na conversão de sacarose em isomaltulose.

Foram testados cinco tipos de alginato de sódio na imobilização de células de *S. plymuthica*: (A) Alginato 250 cP Sigma-A2158 [M/G = 1,56]; (B) Alginato 14000 cP Sigma-A7128 [M/G = 1,56]; (C) Alginato 20.000 cP Sigma-180947 [M/G = 1,56]; (D) Alginato Fluka 71240 [M/G = 2,0]; (E) Alginato Synth-A1089.01AF.

Amostras de 8mL de solução esterilizada de 1,7% de alginato de sódio em água destilada foi adicionada à 4mL de suspensão 30% de massa celular úmida (m:v) na proporção 2:1 (v:v) preparada como descrito no item 3.2.1. Em seguida as suspensões formadas foram gotejadas com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] L/S em solução 0,2 mol/L de CaCl₂ previamente esterilizada para formar grânulos de 3 mm de diâmetro os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com água destilada esterilizada para a remoção do excesso de CaCl₂. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas. Foram transferidos, assepticamente, 7g de grânulos contendo células imobilizadas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução 35% (p/v) de sacarose (açúcar cristal), e

incubados em agitador rotatório a 50 rpm, a 27°C. As amostras de 50 mL de solução de açúcares foram retiradas a cada 24 horas e substituídas por novas amostras de solução de sacarose 35%. As células imobilizadas foram reutilizadas por 3 bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 3.2.1.1. Os resultados foram analisados pelo teste de médias de Tukey com auxílio do software SAS®.

Foi testado também o efeito da adição da enzima transglutaminase Activa TG® (Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda) no aumento da reticulação e aumento da estabilidade das células imobilizadas. A enzima TG é capaz de promover ligações cruzadas entre proteínas da parede celular da bactéria, com isso evitar a perda de massa celular por lixiviação nas transferências de substrato possibilitando maior retenção das células e estabilidade de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose ao longo das bateladas. A transglutaminase Activa TG® é uma mistura de 0,6% de enzima purificada em 60% de caseinato de sódio, 5% de éster de sacarose e 34,4% de dextrina entre outros sacarídeos com atividade igual a 134U/g de proteína. Alíquotas de 1,2g de enzima transglutaminase Activa TG® em pó foram adicionadas às amostras esterilizadas de 60mL de solução 1,7% dos 5 diferentes tipos de alginato de sódio para concentração final de 2% da enzima TG, com lenta agitação magnética até total homogeneização. Em seguida uma alíquota de 8mL desta solução foi adicionada a 4mL de suspensão de massa celular úmida de *S. plymuthica* 30% (m:v), na proporção 2:1 (v:v).

As suspensões foram gotejadas em 60mL de solução de 0,2 mol/L de CaCl_2 esterilizada para formar pequenos grânulos os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com água destilada esterilizada para a remoção do excesso de CaCl_2 . Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas. Amostras de 7g de grânulos contendo células imobilizadas foram transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução 35% (m:v) de sacarose (açúcar cristal) e incubados em agitador rotatório a 50 rpm, a 27°C. As amostras de 50 mL de solução de açúcares foram retiradas a cada 24 horas e substituídas por novas amostras de 50 mL de solução 35% de sacarose. As células imobilizadas foram reutilizadas por 3 bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose foi analisada como descrito no item 3.2.1.1. Os resultados foram analisados pelo teste de médias de Tukey com auxílio do software SAS®.

3.3.2 Otimização da imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG em processo de batelada para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Foram realizados três planejamentos experimentais sequenciais para determinação das condições ótimas de imobilização das células de *S. plymuthica* para conversão de sacarose em isomaltulose por processo em batelada.

Foram realizados testes preliminares (que estão apresentados anexos ao final do trabalho) para estudo do efeito da gelatina e de caseína como fonte protéica na composição da matriz de imobilização. As matrizes de imobilização contendo gelatina em sua composição apresentaram maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose em relação à matriz contendo caseína e resultados cerca de 50% superior em relação à matriz sem a adição desses componentes. Este resultado sugere que a gelatina se apresenta como substrato útil para formação de ligações cruzadas catalisadas pela TG e melhora a retenção das células na matriz de imobilização resultando em maiores taxas de conversão ao longo das bateladas.

3.3.2.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato de sódio, gelatina, transglutaminase e CaCl_2 na matriz de imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Foi estudado o efeito de cinco variáveis (concentração de massa celular (25-35%), alginato (1-3%), gelatina (0,5-1,5%), TG (0,5-1,5%) e cloreto de cálcio (0,1-0,3 mol/L)) em um planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}) (Tabelas 9 e 10) composto de dezesseis ensaios e três repetições no ponto central com um total de 19 ensaios de onde foram selecionadas três variáveis com efeito significativo (concentração de alginato, TG e cloreto de cálcio).

A imobilização celular foi realizada em condições assépticas. As alíquotas de 8mL de solução de alginato-gelatina foram adicionadas à 4mL de suspensão de massa celular úmida de *S. plymuthica* em diferentes concentrações preparada como descrito no item 3.3.1 e em seguida alíquotas da enzima TG em diferentes concentrações foram adicionadas com agitação lenta, em agitador magnético, até total homogeneização. Em seguida as suspensões formadas foram gotejadas em 60mL de solução de CaCl_2 em diferentes concentrações, com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex® L/S para formar grânulos de cerca de 3 mm de diâmetro, os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com água destilada esterilizada para a remoção do excesso de CaCl_2 . As amostras de 7g de grânulos contendo células imobilizadas foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução 35% (p/v) de sacarose (açúcar cristal) e incubados em agitador rotatório a 50 rpm, a 27°C. As amostras de 50 mL de solução de açúcares foram retiradas a cada 24 horas e substituídas por novas amostras de 50mL de solução 35% de sacarose. As células imobilizadas foram reutilizadas por seis bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada por cromatografia líquida como descrito no item 3.2.1.1.

3.3.2.2 Delineamento composto central rotacional DCCR-2³ para estudo dos efeitos da concentração de alginato de sódio, transglutaminase e CaCl₂ na matriz de imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Realizou-se um DCCR-2³, composto de oito ensaios referentes ao fatorial completo 2³, seis ensaios referentes aos pontos axiais e quatro repetições no ponto central, em um total de dezoito ensaios, utilizando as três variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no planejamento anterior com os níveis modificados, sendo alginato (1,5-3,5%), CaCl₂ (0,03-0,36 mol/L), TG (0-1,5%).

A imobilização celular foi feita conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.1. para cada ensaio conforme Tabela 12 e 13.

As células imobilizadas foram reutilizadas por quatro bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada por cromatografia líquida como descrito no item 3.2.1.1.

3.3.2.3 Delineamento composto central rotacional DCCR-2² para estudo dos efeitos da concentração de transglutaminase e massa celular na matriz de alginato de cálcio para imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Neste planejamento foram estudadas duas variáveis (concentração de MC (25-35%) e TG (1,8-3,8%) em DCCR-2² composto de quatro ensaios referentes ao fatorial completo 2², quatro ensaios referentes aos pontos axiais e quatro repetições no ponto central, com um total de doze ensaios.

A imobilização celular foi feita conforme descrito anteriormente no item 3.3.2.1. para cada ensaio conforme as Tabelas 17 e 18.

As células imobilizadas foram reutilizadas por quatro bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada por cromatografia líquida como descrito no item 3.2.1.1.

As análises estatísticas dos modelos gerados pelos delineamentos fatoriais completos foram feitas através de análise de variância (ANOVA) com o uso do programa computacional Statística[®], versão 7.0 (Statsoft[®], 2004). Nestas análises estão inclusos o teste Fisher (F-test) e o coeficiente de determinação (R²). As combinações ótimas das variáveis para a composição do meio de imobilização das células de *S. plymuthica* foram estimadas pelas curvas de contorno e superfície de resposta.

3.3.3 Estudo da imobilização das células de *S. plymuthica* em matriz de pectina de baixo teor de metoxilação amidada, alginato de cálcio, transglutaminase e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

3.3.3.1 Caracterização da pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP)

A ALMP Danisco[®] utilizada foi caracterizada de acordo com FAO (2009) em relação ao seu teor de ácidos galacturônicos (AG), grau de esterificação (GE) e grau de amidação (GA) através de titulometria.

3.3.3.2 Otimização das condições de imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em matriz de pectina de baixo teor de metoxilação amidada, alginato de sódio, transglutaminase e gelatina em processo de batelada para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Foram realizados dois planejamentos experimentais sequenciais para determinação das condições de imobilização das células de *S. plymuthica* em matriz de ALMP, alginato de sódio, gelatina e TG para conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por processo em batelada.

3.3.3.2.1 Estudo dos efeitos de ALMP, massa celular, alginato de sódio, gelatina, transglutaminase e CaCl_2 na imobilização das células de *S. plymuthica* para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por planejamento experimental PB-12

Foram estudados os efeitos de seis variáveis (pectina de baixo teor de metoxilação amidada (0-2%), concentração de massa celular (20-35%), alginato de sódio (1,5-2,5%), gelatina (0-2%), TG (2-4%) e cloreto de cálcio (0,1-0,4 mol/L)) em um planejamento Plackett-Burman – 12 (PB-12) descritos nas Tabelas 22 e 23, e deste foram selecionadas três variáveis (concentração de alginato, gelatina e ALMP). A variável gelatina foi adicionada como fonte protéica importante para a formação de ligações cruzadas catalisadas pela enzima transglutaminase após estudo apresentado anexo ao final deste trabalho.

As misturas de ALMP, alginato de sódio e gelatina em água destilada, soluções de CaCl_2 , frascos Erlenmeyer contendo água destilada e vidrarias foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. A imobilização celular foi realizada em condições assépticas. Em 4mL suspensão de massa celular, preparada como descrito no item 3.2.1, foi adicionada 8mL solução de ALMP-alginato-gelatina, na proporção 1:2 (v:v) e em seguida a enzima transglutaminase foi adicionada com agitação lenta, em agitador magnético, até total homogeneização. Em seguida as suspensões formadas foram gotejadas em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 60mL de solução de CaCl_2 , com auxílio

de uma bomba peristáltica MasterFlex® L/S para formar grânulos de cerca de 3 mm de diâmetro, os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com cerca de 150mL de água destilada esterilizada para a remoção do excesso de CaCl₂. As amostras de grânulos contendo células imobilizadas (7g) foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução 35% (p/v) de sacarose (açúcar cristal) preparada como descrito no item 3.2.1 e incubados em agitador rotatório a 50 rpm, a 27°C. As amostras de 50 mL de solução de açúcares foram retiradas a cada 24 horas e substituídas por novas amostras de 50 mL de solução 35% de sacarose. As células imobilizadas foram reutilizadas por quatro a cinco bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada como descrito no item 3.2.1.1.

3.3.3.2.2 Estudo dos efeitos de ALMP, alginato de sódio e gelatina na imobilização das células de *S. plymuthica* para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por planejamento experimental DCCR-2³

Um planejamento experimental DCCR-2³ foi utilizado para determinar os efeitos das variáveis concentração de alginato de sódio (0-3%), ALMP (0-4%) e gelatina (0-2%) descrito nas Tabelas 26 e 27. Neste estudo foram testadas as

variáveis na concentração zero, no nível inferior, com o intuito de verificar, também, o efeito da ausência dessas variáveis e o nível superior da variável alginato foi elevado, em relação ao planejamento anterior. As análises estatísticas dos modelos gerados pelos fatoriais completos foram feitas através de análise de variância (ANOVA) com o uso do programa computacional Statística[®], versão 7.0 (Statsoft[®], 2004). Nestas análises estão inclusos o teste Fisher (F-test) e o coeficiente de determinação (R^2). As combinações ótimas das variáveis para a composição da matriz de imobilização das células de *S. plymuthica* foram estimadas pelas curvas de contorno e superfície de resposta.

A imobilização celular foi feita conforme descrito anteriormente no item 3.3.3.2.1.

As células imobilizadas foram reutilizadas por quatro bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada por cromatografia líquida como descrito no item 3.2.1.1.

3.3.3.2.3 Testes em triplicatas das melhores concentrações de alginato de sódio ALMP, gelatina, transglutaminase e CaCl_2 obtidas nos dois ensaios anteriores para a imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose

Foram realizados dois testes em triplicata, um com a ALMP autoclavada e outro com a ALMP sem passar pelo processo de autoclavagem com o objetivo de verificar a interferência desse processo no polissacarídeo e na formação da matriz de imobilização e simultaneamente testar as melhores condições de imobilização das células de *S. plymuthica* encontradas nos ensaios anteriores. Foram eleitas as melhores condições para a obtenção das maiores taxas de conversão e estabilidade dos estudos anteriores.

As concentrações das variáveis utilizadas nos dois testes estão mostradas na Tabela 31, a concentração de massa celular que foi mantida fixa em 38%.

A imobilização celular foi feita conforme descrito anteriormente no item 3.3.3.2.1.

As células imobilizadas foram reutilizadas por quatro bateladas. A conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose foi analisada por cromatografia líquida como descrito no item 3.2.1.1.

3.3.4 Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de alginato-gelatina-TG em processo contínuo, utilizando coluna de leito empacotado.

3.3.4.1 Imobilização celular

Alíquotas de 20mL de suspensão celular úmida 34% (m:m) de *S. plymuthica* preparada como descrito no item 3.2.1 foram adicionadas em condições assépticas às alíquotas de 40mL de solução de alginato- gelatina-TG. Para a preparação desta última solução, 1,4g de transglutaminase Activa TG[®] (para concentração final de 3,5% (m:v)) foi adicionada em 40 mL solução contendo 1,7% de alginato de sódio 14.000cP Sigma[®]-A7128, 0,5% de gelatina Vetec[®] em água destilada com agitação lenta utilizando-se agitador magnético, até total homogeneização e previamente autoclavada a 121°C por 15 min. Em seguida as amostras de suspensões obtidas foram gotejadas, em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 300mL de solução 0,25mol/L de CaCl₂ previamente esterilizado por autoclavagem como descrito acima com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] R/S para formar grânulos de cerca de 3 mm de diâmetro, os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com cerca de 500mL de água destilada esterilizada para a remoção do excesso de CaCl₂.

3.3.4.2 Efeito da temperatura e do fluxo de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando-se células de *S. plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TG, em processo contínuo utilizando-se colunas empacotadas.

As amostras de grânulos contendo as células imobilizadas (96g), preparados conforme item 3.3.4.1 foram transferidas para colunas encamisadas (30 x 150 mm) e a solução 35% (m/v) de sacarose (açúcar cristal) preparada conforme item 3.2.1 foi circulada em sentido ascendente nas colunas de leito empacotado a 0,2; 0,3; 0,5 e 0,65mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] L/S. As colunas foram mantidas nas temperaturas de 25 e 27°C utilizando-se banho de circulação ultratermostático Quimis[®] Q-14M2 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Campinas, SP, BR). Combinando-se as variáveis, foram preparadas seis colunas: Coluna 1: fluxo de 0,3mL/min a 25°C; Coluna 2: fluxo de 0,2mL/min a 25°C; Coluna 3: fluxo de 0,5mL/min a 25°C; Coluna 4: fluxo de 0,65mL/min a 25°C; Coluna 5: fluxo de 0,3mL/min a 27°C e Coluna 6: fluxo de 0,2mL/min a 27°C. A Figura 2 ilustra os equipamentos e colunas empacotadas para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas de *S. plymuthica* em processo contínuo. Foram retiradas amostras de 1mL a cada 12 horas de conversão e congeladas para posterior análise de carboidratos como descrito no item 3.2.1.1.



Figura 2. Produção de isomaltulose, a partir de sacarose, por células de *S. plymuthica* imobilizadas em colunas de leito empacotado.

- (a) banho ultratermostático para a manutenção da temperatura das colunas.
- (b) bomba peristáltica para a manutenção da alimentação das colunas.
- (c) colunas encamisadas empacotadas com os grânulos de células íntegras imobilizadas.
- (d) banhos-maria para manutenção da temperatura do substrato sacarose.
- (e) frascos Erlenmeyers contendo substrato sacarose 35%.
- (f) frascos para recolhimento do produto convertido.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Conversão de sacarose em isomaltulose e outros carboidratos por células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928 produtora de glicosiltransferase.

4.1.1 Conversão de açúcar cristal em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos por células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928

A glicosiltransferase das células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928 converteu a solução de 35% de sacarose (açúcar cristal) a 25°C produzindo alto teor de isomaltulose (79%) e também trealulose (8,2%), glicose (4,9%), frutose (4,9%), sendo pequena que concentração de sacarose (2,9%) não foi hidrolisada (Figura 3).

VERONESE e PERLOT (1999) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando sacarose isomerase intracelular de *S. plymuthica* ATCC 15928. Utilizando a enzima purificada obtiveram 72% de isomaltulose seguido de 6,6% de trealulose e 10,1% de glicose e frutose, Com um resultado semelhante ORSI (2008) relatou que a glicosiltransferase de *S. plymuthica* ATCC 15928 foi

capaz de converter sacarose com alto rendimento de isomaltulose (75,2%), seguido de trealulose 6% e glicose e frutose (menor que 10%).

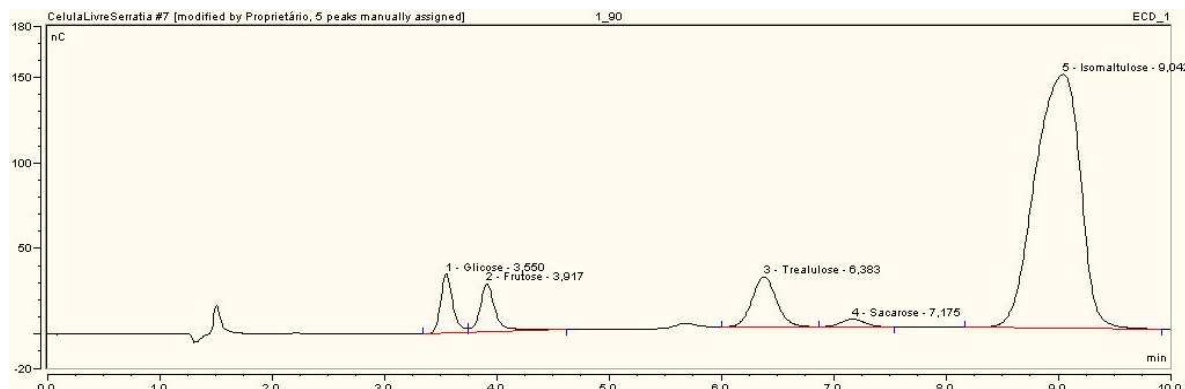


Figura 3. Cromatograma dos açúcares isomaltulose, trealulose, glicose e frutose formados a partir de sacarose utilizando-se células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928 produtoras de glicosiltransferase.

KAWAGUTI e colaboradores (2010c) descreveram que a glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 converteu a solução de 35% de sacarose em 65,75% de isomaltulose.

Por outro lado a glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX 45 converte a sacarose produzindo alto teor de trealulose (83%) (NAGAI, *et al.*, 2003).

4.1.2 Estudo dos efeitos da concentração de substrato e temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* por planejamento experimental DCCR 2² e confirmação por ensaio em duplicata.

Foram avaliados os efeitos da concentração do substrato sacarose e da temperatura na conversão de sacarose pelas células livres de *S. plymuthica*, utilizando-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta como descrito no item 3.2.2.

A Tabela 1 ilustra o planejamento fatorial completo 2² (DCCR-2²) contendo os ensaios realizados, com os valores codificados e reais das concentrações utilizadas, e os resultados de porcentagem de isomaltulose obtidos.

Tabela 1. Planejamento fatorial completo 2^2 codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) para estudo dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* em processo em batelada.

Ensaio	Parâmetro		Isomaltulose* (%)
	Substrato (%)	Temperatura (°C)	
1	-1 (30)	-1 (25)	79,0
2	+1 (50)	-1 (25)	59,6
3	-1 (30)	+1 (35)	71,5
4	+1 (50)	+1 (35)	68,2
5	0 (40)	0 (30)	72,6
6	0 (40)	0 (30)	73,2
7	0 (40)	0 (30)	75,3
8	0 (40)	0 (30)	71,6

* Conversão de sacarose em isomaltulose após 75 minutos de reação.

As análises estatísticas foram realizadas a partir dos resultados referentes a 75 minutos de reação, devido às maiores taxas de conversão atingidas pela maioria dos ensaios e pela validação estatística dos resultados. No DCCR-2², pode-se observar que a produção de isomaltulose variou de um mínimo de 59,6% no ensaio 2, em que foi utilizado 50% de sacarose e temperatura 25°C, a um máximo de conversão de 79,0% no ensaio 1, em que foi usado 30% de sacarose e a temperatura de 25°C (Tabela 1). Foram observados menores valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se alta concentração de substrato (50% de sacarose) (ensaios 2 e 4).

Os efeitos principais e a interação dos parâmetros estudados no DCCR-2² encontram-se na Tabela 2. Foi verificado que o parâmetro concentração de substrato sacarose afetou significativamente ($p < 0,05$) a produção de isomaltulose; sendo que, o efeito principal negativo sugere que o aumento da concentração de substrato, dentro da faixa estudada, resultaria em uma diminuição na conversão de isomaltulose. O parâmetro temperatura não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$). No entanto o efeito combinado, ou a interação da temperatura com a concentração de substrato sacarose apresentou efeito positivo na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres.

Tabela 2. Efeitos principais e interações dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura (DCCR-2²) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* em processo em batelada.

	Efeito	Erro Padrão	<i>t</i> (3)	<i>p</i>
(1) Substrato*	-11,3587	1,3616	-8,3424	0,0036
(2) Temperatura	0,5179	1,3616	0,3804	0,7290
1L x 2L*	8,0481	1,3616	5,9109	0,0097

*parâmetros estatisticamente significativos a $p < 0,05$.

A Tabela 3 apresenta os valores de *t*, *p* e coeficientes de regressão utilizados para a construção do modelo polinomial referente a conversão de sacarose em isomaltulose a partir dos parâmetros estudados no DCCR-2². A Tabela 4 mostra a análise de variância (ANOVA) do estudo de obtenção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando-se células livres de *S. plymuthica*.

Tabela 3. Coeficientes de regressão, desvios padrão, t e p dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura do DCCR-2² para estudo da conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* em processo em batelada.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	t (3)	p
Média*	71,8191	0,4814	149,1919	0,0000
(1) Substrato*	-5,6794	0,6808	-8,3424	0,0036
(2) Temperatura	0,2589	0,6808	0,3804	0,7290
1L x 2L*	4,0240	0,6808	5,9109	0,0097

*parâmetros estatisticamente significativos a $p < 0,05$.

A equação obtida a partir dos parâmetros estudados pode ser considerada preditiva e significativa a um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste F, em que o $F_{\text{experimental}}$ (10,48) foi maior do que o F_{tabelado} , com valor correspondente de 5,79 (Tabela 4). A adequação da equação foi verificada pelo coeficiente de determinação ($R^2=0,82$). O erro puro apresentou um baixo valor de 5,56, indicando boa reprodutibilidade dos valores obtidos referentes aos ensaios realizados nos pontos centrais do DCCR-2². Estes resultados foram suficientes e satisfatórios para a obtenção de uma equação (Equação 1) que representa a relação real entre os parâmetros independentes e a conversão de isomaltulose.

$$y = 71,82 - 5,67x_1 + 4,02x_1x_2 \quad \text{Equação 1}$$

onde y , x_1 e x_2 correspondem a concentração de isomaltulose (%), substrato solução de sacarose e a temperatura do substrato, respectivamente.

Tabela 4. Análise de variância dos resultados dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato e da temperatura (DCCR-2²) na conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* em processo em batelada.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{experimental}
Regressão	193,7923	2	96,8962	10,4838
Resíduos	46,2126	5	9,2425	
Falta de Ajuste	40,6510	2		
Erro Puro	5,5616	3		
Total	240,0048	7		

Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,82$; coeficiente de correlação: $R = 0,90$. $F_{0,95;2;5} = 5,7861$.

Após a ANOVA e validação dos parâmetros estudados, a equação de primeira ordem que representa a produção de isomaltulose a partir de células livres de *Serratia plymuthica* foi utilizada para gerar a superfície de resposta e curva de contorno (Figura 4). Pode-se observar que maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose foram obtidas utilizando-se temperatura a 25°C e solução de sacarose 30%, quando foi verificada máxima conversão de 79,0% em isomaltulose.

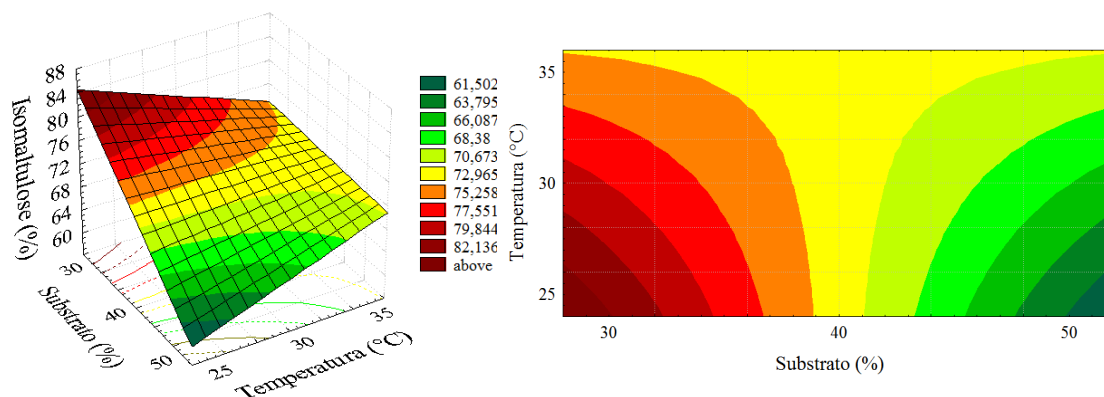


Figura 4. Superfície de resposta e curva de contorno do estudo de conversão de sacarose em isomaltulose por células livres de *S. plymuthica* em função da concentração de substrato sacarose e da temperatura em processo em batelada do DCCR-2².

Para confirmação dos resultados foi realizado um experimento utilizando-se os parâmetros de concentração de substrato sacarose e temperatura com base nos resultados dos ensaios do experimento anterior. Foram utilizadas concentrações de sacarose de 30-40%, que mostraram maiores taxas de conversão em isomaltulose no DCCR anterior e temperaturas de reação de 25-30°C. Sendo as condições dos três experimentos simultâneos descritas na Tabela 5. As células livres de *Serratia plymuthica* foram reutilizadas por 7 bateladas de 15 minutos.

Tabela 5. Ensaios para o estudo dos efeitos dos parâmetros concentração de substrato sacarose (30 e 40%) e da temperatura (25-30°C) na conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de *S. plymuthica* em processo em batelada

Ensaio	Parâmetro	
	Substrato (%)	Temperatura (°C)
A	40	25
B	30	25
C	40	30

A Tabela 6 apresenta os valores de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose, por células livres de *S. plymuthica*, em processo em batelada, referentes aos ensaios A, B, e C. A Figura 5a-c mostra a conversão de sacarose em outros açúcares em cada um dos três ensaios A, B, e C.

Tabela 6. Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos ensaios A, B e C do estudo dos efeitos da concentração de substrato (30 e 40%) e da temperatura (25 e 30°C) utilizando-se células livres de *S. plymuthica*.

Batelada	Ensaio A		Ensaio B		Ensaio C	
	% Isomaltulose	% Trealulose	% Isomaltulose	% Trealulose	% Isomaltulose	% Trealulose
1	69,5±1,8	6,5±0,3	77,7±0,7	7,7±0,1	67,0±0,5	7,5±0,1
2	65,8±1,0	6,7±0,2	75,5±1,0	7,5±0,1	69,3±1,1	8,0±0,2
3	66,5±0,9	7,0±0,2	76,2±0,9	7,5±0,0	70,2±1,0	7,8±0,6
4	66,8±0,2	7,1±0,2	75,8±1,8	7,5±0,1	67,3±0,9	9,6±1,6
5	66,2±2,1	7,1±0,3	75,0±0,3	7,5±0,2	68,6±1,9	8,6±0,4
6	61,8±5,5	8,3±1,7	74,4±1,7	7,4±0,0	69,9±2,5	7,7±0,4
7	60,1±1,6	7,7±0,2	71,5±0,6	7,0±0,4	58,7±3,2	8,7±0,4

Ensaio A: 40% sacarose e 25°C; Ensaio B: 30% sacarose e 25°C; Ensaio C: 40% sacarose e 30°C

As maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose de 71,5-77,7% foram obtidas no ensaio B, em que foi utilizada concentração de substrato solução de sacarose 30% a 25°C (Tabela 6). As células livres também se mantiveram estáveis por sete bateladas de 15 min (Figura 5b). Esse resultado confirmou o resultado obtido no DCCR 2² que apresentou a maior taxa de conversão de sacarose em isomaltulose nessas mesmas condições (79% de isomaltulose após 75 minutos de reação).

Nos ensaios A e C em que foram usados 40% de sacarose obteve-se respectivamente 60,1-69,5% e 58,7-70,2% de isomaltulose, não apresentaram diferença significativa nas taxas de conversão e na estabilidade. Apesar da diferença de temperatura de reação, foi observado uma pequena queda na taxa

de conversão na sétima batelada (Figura 5A e 5C). Entretanto o aumento da concentração de sacarose de 30% (Ensaio B) para 40% (Ensaio A e C) resultou na diminuição da conversão de sacarose em isomaltulose. Os valores de conversão de sacarose em trealulose foram similares nos três ensaios, em que foram obtidos cerca de 6,5-9,6% de trealulose.

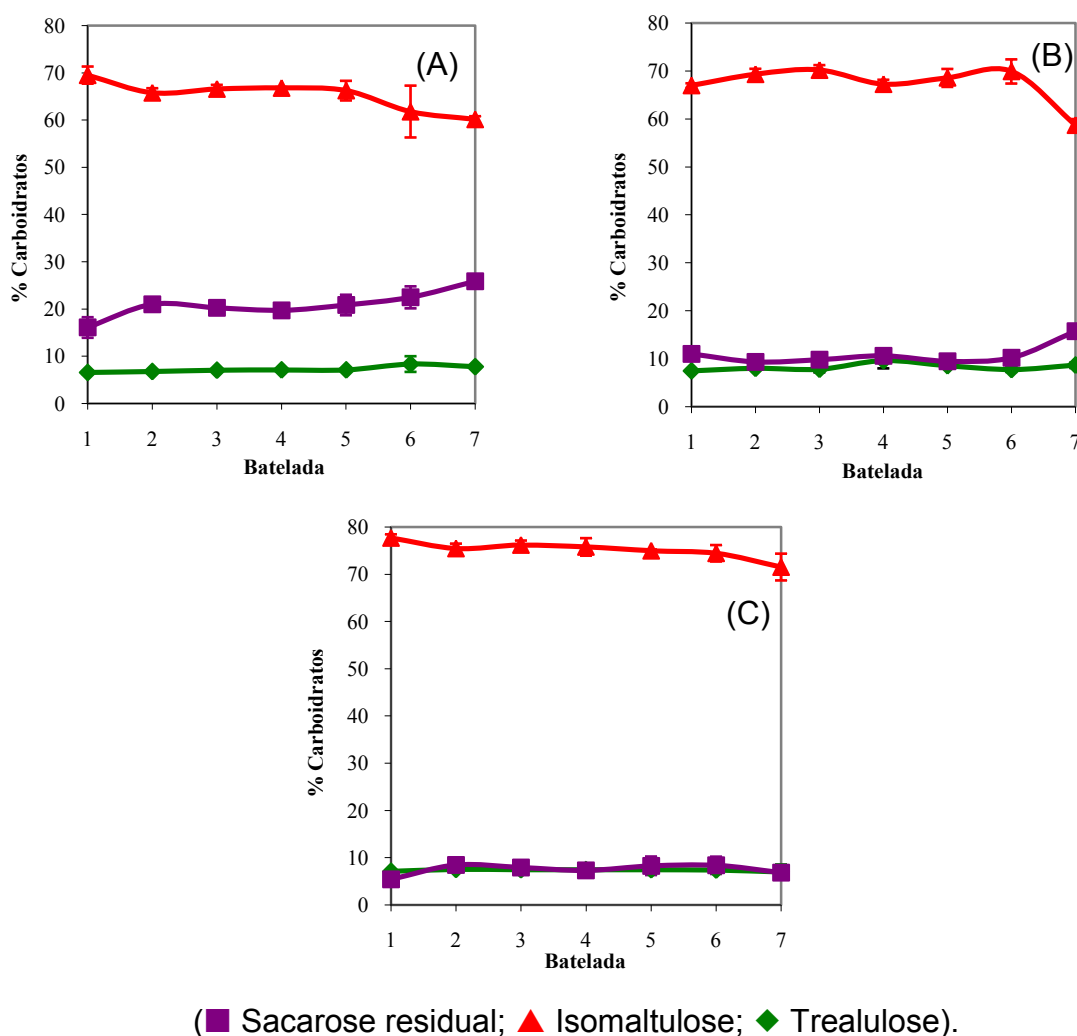


Figura 5. Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células livres de *S. plymuthica* em função da concentração de substrato sacarose e da temperatura: Ensaio (A) 40% de sacarose, 25°C; Ensaio (B) 30% de sacarose, 25°C; Ensaio (C) 40% de sacarose, 30°C.

4.1.3 Estudo da taxa de reuso das células livres de *S. plymuthica* para conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose e outros carboidratos.

A taxa de reuso das células livres de *S. plymuthica* durante a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose e outros carboidratos foi testada em condições otimizadas como descrito no item 3.2.3.

A Figura 6 mostra a conversão de solução 30% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose a 25°C utilizando-se células livres de *S. plymuthica*, durante 10 bateladas consecutivas com tempo de incubação de 15 minutos cada, e a variação da massa celular úmida e pH.

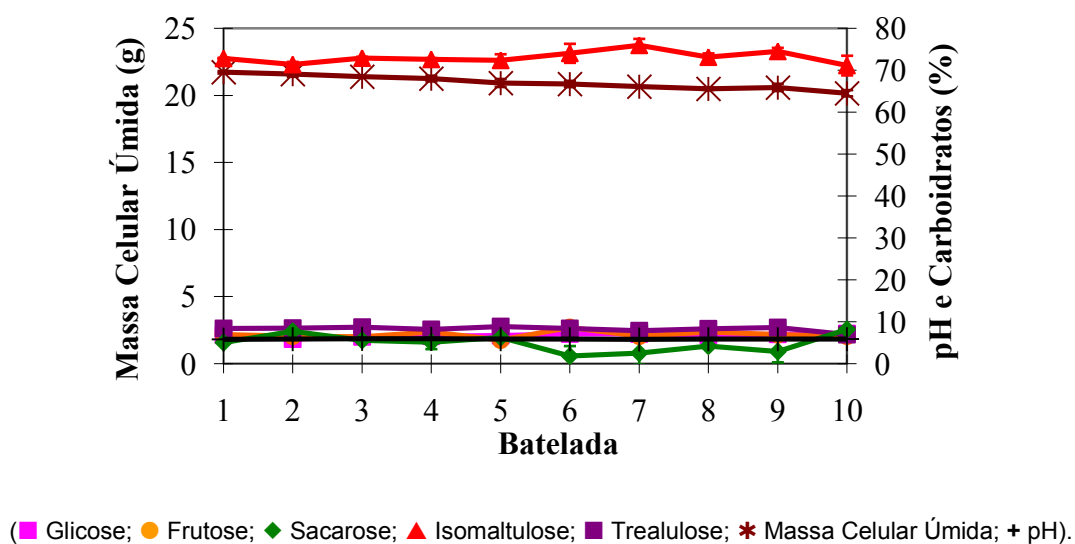


Figura 6. Conversão de solução 30% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose, a 25°C em condições otimizadas utilizando-se células livres de *S. plymuthica*.

Foram obtidos valores de conversão em isomaltulose acima de 70% em todas as 10 bateladas realizadas. Foram obtidos 7-8% de trealulose, 5-7% de glicose e 5-8% frutose e 1-8% de sacarose durante o processo. Observou-se que a variação do pH foi pequena (entre pH 6,0 e 5,8) durante o processo de conversão e que houve perda de 7,1% de massa celular durante 10 bateladas de reutilização da *S. plymuthica* (Figura 6). As células mostraram estabilidade e reprodutibilidade na transformação da sacarose em isomaltulose e trealulose. A alta taxa de conversão de sacarose em isomaltulose foi mantida durante dez bateladas de 15 minutos.

4.2 Estudo da imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 para conversão de sacarose em isomaltulose.

4.2.1 Efeito do tipo de alginato e da adição de transglutaminase na imobilização das células de *S. plymuthica* e na conversão de sacarose em isomaltulose.

A imobilização das células de *S. plymuthica* em diferentes tipos de alginato e o efeito da adição da enzima TG na conversão de sacarose em isomaltulose foi testada como descrito no item 3.3.1.

As células de *S. plymuthica* imobilizadas nos alginatos de sódio (A) Alginato 250 cP Sigma-A2158 [M/G = 1,56]; (B) Alginato 14000 cP Sigma-A7128 [M/G = 1,56]; (C) Alginato 20.000 cP Sigma-180947[M/G = 1,56]; (D) Alginato Fluka 71240 [M/G = 2,0]; (E) Alginato Synth-A1089.01AF converteram cerca de $57,5 \pm 9,6$ a $69,7 \pm 0,8$ % da sacarose em isomaltulose, na primeira batelada. No entanto, na segunda e terceira bateladas a conversão diminuiu para cerca de 8,7 a 10% e 1,2 a 1,4%, respectivamente (Figura 7 e Tabela 7a).

Observou-se que na primeira batelada, utilizando-se células de *S.plymuthica* imobilizadas com os diferentes tipos de alginato de sódio contendo transglutaminase, (Figura 8 e Tabela 7b) os valores de conversão de sacarose em isomaltulose foram menores ($37,2 \pm 14,2$ a $63,4 \pm 8,5\%$) comparados com os

valores obtidos utilizando-se as células imobilizadas com os diferentes tipos de alginato de sódio sem adição de transglutaminase (Figura 7 e Tabela 7a) ($57,5 \pm 9,6$ a $69,7 \pm 0,8\%$). No entanto a adição de TG na mistura de alginato de sódio e suspensão de massa celular contribuiu para o aumento na porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose na segunda e terceira bateladas sendo observado redução da conversão menos brusca entre as bateladas, indicando maior estabilidade das células imobilizadas durante a reutilização, comparado com os ensaios sem adição de TG. Notou-se que a maior taxa média de conversão, entre as três bateladas estudadas, obtida com adição de 1,2g da enzima TG (2% em relação à solução de alginato de sódio) na imobilização celular (49,4%) foi 80% maior que a taxa média obtida sem a adição da TG (27,3%) (Tabela 7). A TG catalisa a formação de ligações cruzadas entre resíduos de lisina e glutamina entre proteínas, aumentando a reticulação e retenção das células.

SYNOWIECKI & WOLOSOWSKA (2006) utilizaram a enzima TG para a imobilização de β -glucosidase de *Sulfolobus shibatae* em sílica gel modificada com 3-aminopropil-trietoxilano. Os resultados indicaram que a atividade da β -glicosidase aumentou 4 vezes após imobilização em presença de TG. Esse resultado sugere que a participação das ligações covalentes catalisadas pela TG promove a formação de ligações cruzadas entre a enzima e a superfície do suporte. Os autores citaram que comparado com os métodos químicos, a utilização de TG para a formação de ligações cruzadas requer condições brandas que permitem a imobilização de enzimas lábeis. Além disso, a sua aplicação evita

a contaminação da enzima imobilizada com resíduos de reagentes de acoplamento.

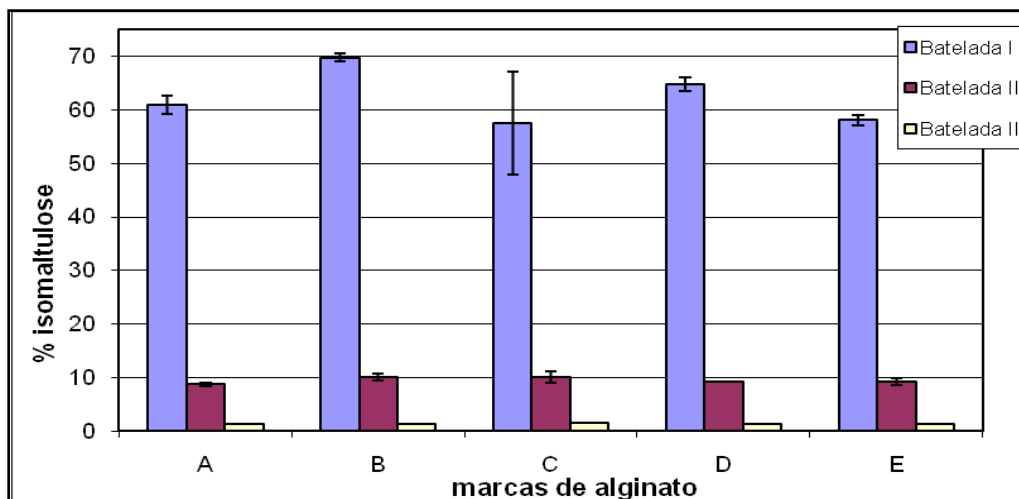


Figura 7. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de *S. plymuthica* imobilizadas em diferentes marcas de alginato de sódio sem adição da enzima TG.

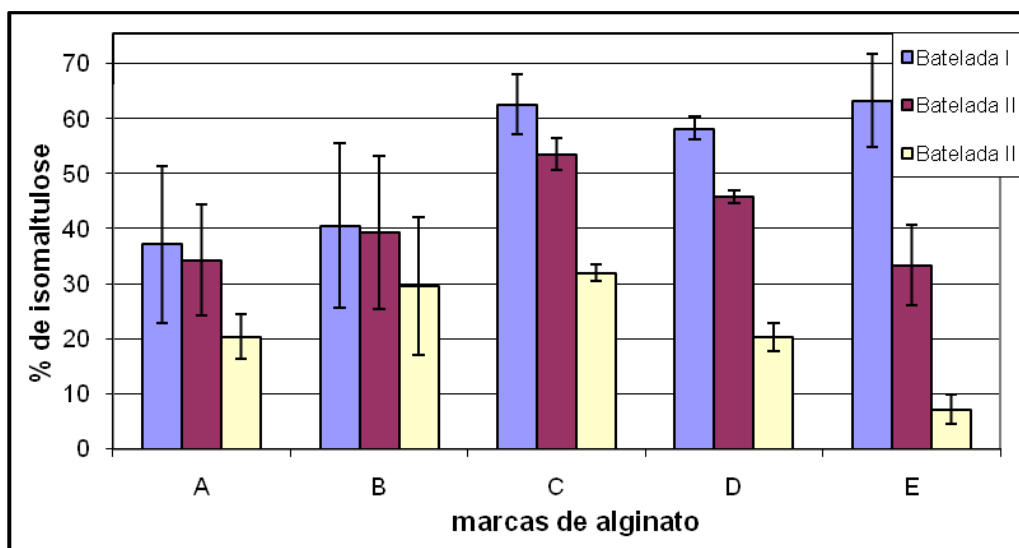


Figura 8. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células de *S. plymuthica* imobilizadas em diferentes marcas de alginato de sódio com adição da enzima TG.

A Tabela 7 ilustra que houve diferença significativa com 5% de significância pelo teste de TUKEY[®] entre os testes realizados com os diferentes tipos de alginato, sendo que no experimento sem a adição de TG obteve-se maior taxa de conversão à partir das células imobilizadas com o alginato B, enquanto que nos experimentos realizados com adição de TG obteve-se maior taxa de conversão a partir das células imobilizadas com o alginato C, entretanto este não apresentou diferença significativa em relação ao alginato B.

Neste estudo a fonte protéica disponível para atuação da enzima TG pode ter sido o caseinato usado como excipiente da enzima comercial (ACTIVA-TG-BP[®] - Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda.) equivalente a cerca de 0,8g de caseinato em 100mL de suspensão contendo células, alginato de sódio e TG. A TG pode promover a formação de ligações cruzadas favorecendo a retenção da *S. plymuthica* na matriz de imobilização o que permitiu a queda menos brusca de conversão de sacarose em isomaltulose na segunda e terceira bateladas, quando comparado com as matrizes sem a presença de TG.

Tabela 7. Porcentagem de isomaltulose e desvio padrão utilizando células de *S. plymuthica* imobilizadas em diferentes tipos de alginato (A,B,C,D e E): (a) sem adição da enzima TG e (b) com adição da enzima TG.

		Tipos de Alginato				
Batelada		A	B	C	D	E
	% média entre triplicatas de conversão de sacarose em isomaltulose e desvio padrão					
(a)	1	60,9 ^{ab} ±1,8	69,7 ^a ±0,8	57,5 ^b ±9,6	64,7 ^{ab} ±1,2	58,0 ^{ab} ±0,9
	2	8,7 ^c ±0,3	10,0 ^c ±0,7	10,0 ^c ±1,0	9,3 ^c ±0,0	9,2 ^c ±0,6
	3	1,2 ^d ±0,0	1,4 ^d ±0,0	1,5 ^d ±0,0	1,3 ^d ±0,0	1,4 ^d ±0,0
	Média das bateladas	23,6	27,3	23	25,1	22,9

		Tipos de Alginato				
Batelada		A	B	C	D	E
	% média entre triplicatas de conversão de sacarose em isomaltulose e desvio padrão					
(b)	1	37,2 ^a ±14,2	40,6 ^a ±14,9	62,6 ^a ±5,4	58,3 ^a ±2,1	63,4 ^a ±8,5
	2	34,4 ^b ±10,2	39,3 ^b ±14,0	53,6 ^b ±2,8	45,9 ^b ±1,2	33,4 ^b ±7,3
	3	20,4 ^{cd} ±4,0	29,6 ^c ±12,4	32,1 ^c ±1,4	20,3 ^{cd} ±2,5	7,2 ^d ±2,7
	Média das bateladas	30,7	37,4	49,4	41,5	34,7

As letras sobrescritas referem-se ao resultado do teste de Tukey (p<0,05) sobre os valores médios entre as triplicatas por bateladas. Letras distintas nas linhas indicam diferenças significativas .

Os tipos de alginato de sódio A, D e E apresentaram baixa viscosidade, inferior a 250cP medidos em solução 2% a 25°C, enquanto os tipos de alginato B e C apresentaram alta viscosidade, superior a 14.000cP mensurados sob mesma condição. Foi observado experimentalmente que os tipos de alginato com valores de viscosidade intermediários apresentaram maior facilidade de manuseio durante as etapas do processo de imobilização. O alginato B apresentou maior facilidade de dissolução e escoamento durante o processo de imobilização em relação ao

tipo C. Enquanto a alta viscosidade do alginato tipo C dificultou o bombeamento, pela bomba peristáltica, como também o gotejamento na solução de CaCl_2 .

As células de *S. plymuthica* imobilizadas em alginatos B e C com TG foram os que apresentaram maiores médias de conversão de sacarose em isomaltulose (37,4 e 49,4%). A análise estatística indicou que a diferença dos resultados de conversão de sacarose em isomaltulose entre esses dois ensaios não foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% pelo teste de médias de TUKEY[®] (Tabela 7b).

O alginato tipo B foi escolhido para os experimentos seguintes porque os grânulos de células imobilizadas preparados com esse alginato apresentaram melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose, com e sem adição da enzima transglutaminase como agente reticulante e porque apresentou como vantagem maior facilidade de dissolução, escoamento e gotejamento.

4.2.2 Otimização das condições de imobilização das células de *S. plymuthica* em matriz de alginato de cálcio-gelatina com adição de TG, em processo de bateladas, para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

Para o estudo dos efeitos das variáveis independentes (concentração de MC, alginato de sódio, gelatina, TG e CaCl_2) na imobilização das células de *Serratia plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose foram realizados três planejamentos experimentais seqüenciais como descrito no item 3.3.2.

A variável gelatina esterilizada por processo de autoclavagem teve sua aplicação justificada por ensaios apresentados no anexo deste trabalho, onde verificou-se aumento de cerca de 50% nos resultados de conversão de sacarose em isomaltulose ao longo de três bateladas quando utilizou-se matrizes de imobilização compostas com 1% de gelatina em relação à matriz controle. E também quando comparada a matriz composta com 1% de caseína observou-se resultados até 30% superiores de conversão de sacarose em isomaltulose além de vantagens do uso de gelatina em relação a caseína como fonte protéica como solubilidade e custos.

4.2.2.1 Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo dos efeitos das concentrações de MC, alginato de sódio, gelatina, TG, e CaCl_2 na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

A Tabela 8 apresenta as variáveis independentes e os valores de seus níveis decodificados utilizados neste planejamento experimental fracionado 2^{5-1} e a Tabela 9 os valores codificados empregados em cada ensaio. As concentrações das variáveis testadas foram nas faixas 25-35% de massa celular úmida de *S. plymuthica* (m:m), 1-3% de alginato de sódio 14000cP-Sigma- A7128 (m:v), 0,5-1,5% de gelatina (m:v), 0,5-1,5% de TG (m:v) e 0,1-0,3 Mol/L de CaCl_2 .

Tabela 8. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} para a otimização da composição da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
% Massa Celular (m:m)	25	30	35
% Alginato (m:v)	1	2	3
% Gelatina (m:v)	0,5	1	1,5
% TG (m:v)	0,5	1	1,5
CaCl_2 (mol/L)	0,1	0,2	0,3

A Tabela 10 e a Figura 9 ilustram os resultados de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose obtidos em cada um dos ensaios para as seis bateladas estudadas e a média dos resultados. Pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos no ensaio 16 (66,0%) onde todos os parâmetros foram

empregados no nível mais alto (+1). No ensaio número 16 foi obtido um aumento de 56% na taxa de conversão de sacarose em isomaltulose comparado com o ensaio número 2 que apresentou menor valor de conversão do açúcar (29,1%).

Tabela 9. Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato de sódio, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 e na conversão de sacarose em isomaltulose por processo em bateladas (24h).

Ensaio	Massa Celular	Alginato	Gelatina	TG	CaCl_2
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 10. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante seis bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos nos 20 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica*.

Ensaio	batelada 1	batelada 2	batelada 3	batelada 4	batelada 5	batelada 6	MÉDIA
% de conversão de sacarose em isomaltulose							
1	73,0	64,9	58,4	45,3	36,5	36,3	52,4
2	71,9	65,4	26,2	8,0	2,4	0,6	29,1
3	75,2	60,5	30,4	11,2	3,7	1,2	30,3
4	72,8	68,8	66,6	57,6	47,0	26,0	56,5
5	74,5	65,0	43,0	26,4	16,0	8,4	38,9
6	72,6	68,4	63,7	48,8	39,1	25,1	52,9
7	73,7	66,5	57,3	41,5	24,3	10,9	45,7
8	74,8	63,4	36,6	14,0	4,3	1,3	32,4
9	72,1	72,2	64,8	50,7	40,2	30,0	55,0
10	72,1	72,2	61,8	48,4	34,5	22,6	51,9
11	73,0	66,5	57,1	50,0	38,9	26,7	52,0
12	72,1	71,4	64,1	56,7	47,6	34,0	57,7
13	72,0	72,7	63,3	57,6	48,9	27,0	56,9
14	71,9	72,4	52,0	30,9	18,5	34,0	46,6
15	69,1	67,7	55,0	44,1	29,7	17,3	47,1
16	71,8	72,0	71,5	67,8	62,0	51,2	66,0
17	72,6	70,6	56,7	46,0	29,9	16,4	48,7
18	71,8	71,5	65,0	56,1	30,3	26,5	53,5
19	72,1	65,1	54,2	41,0	24,3	12,2	44,8

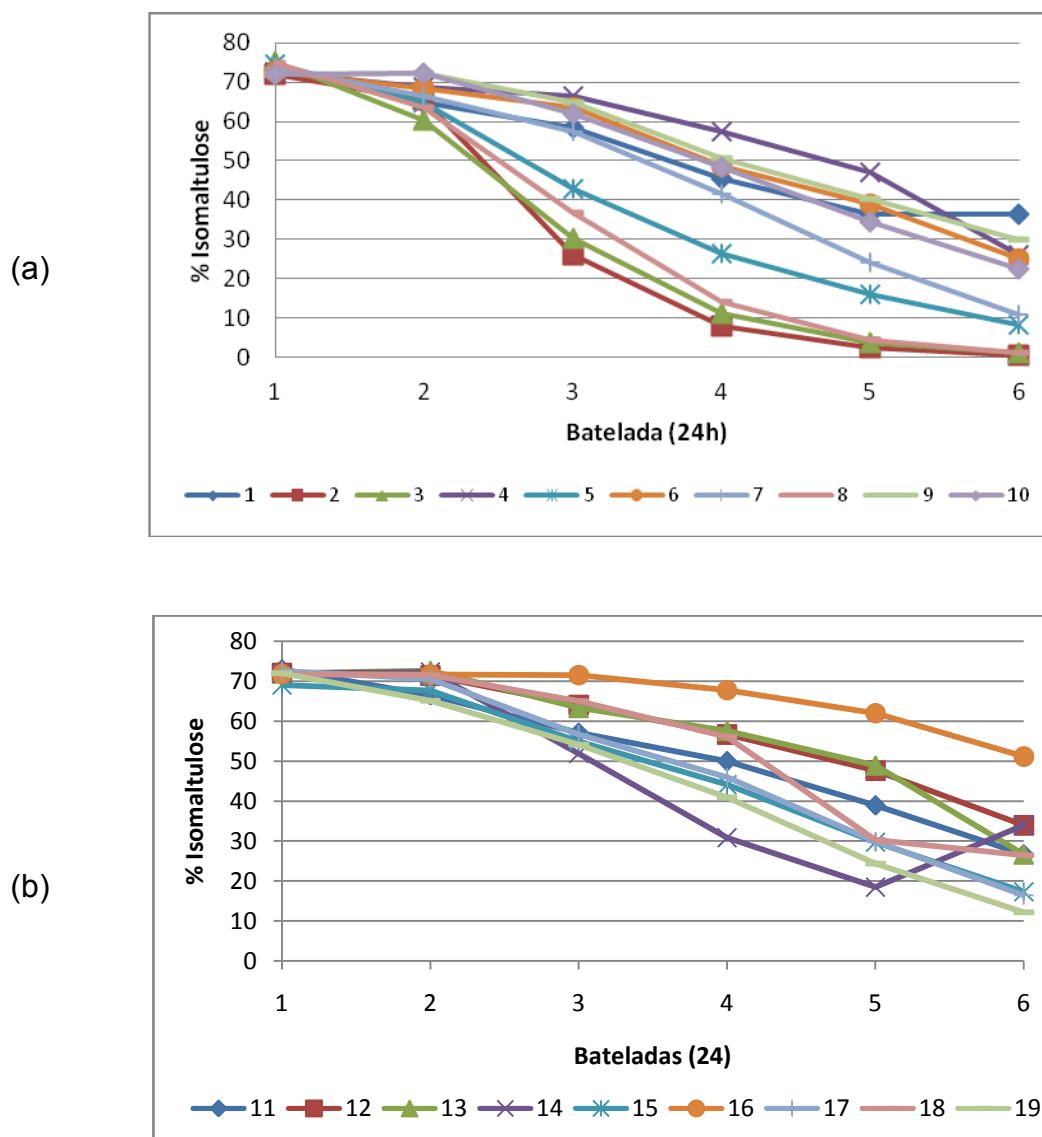


Figura 9. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 19 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} durante seis bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.

(a) ensaios de 1 a 10; (b) ensaios de 11 a 19.

A Figura 10 mostra a média dos resultados de seis bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose dos 20 ensaios do planejamento

fracionado (2^{5-1}). O ensaio 16 apresentou a maior média de conversão de solução 35% de sacarose, sendo obtidos 66,0% de isomaltulose e 8,29% de trealulose, enquanto o ensaio 2 apresentou a menor média de conversão com 29,1% de isomaltulose e 4,16% de trealulose.

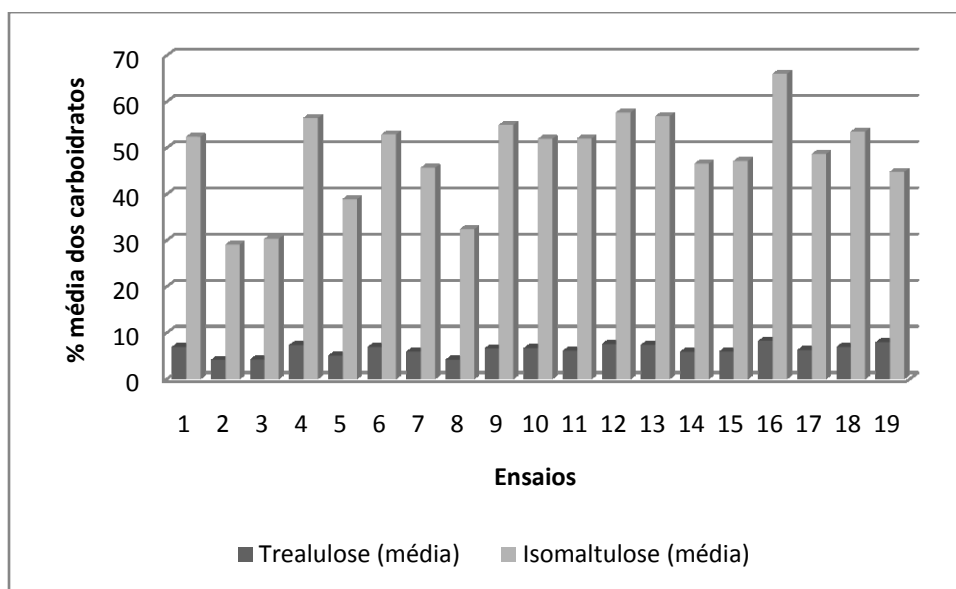


Figura 10. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 20 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo dos efeitos da concentração de massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica*.

A Tabela 11 ilustra os resultados dos efeitos dos parâmetros em cada batelada, assim como o desvio padrão e os limites de confiança ao nível de significância de 90%. Pode-se observar que os parâmetros transglutaminase e CaCl_2 apresentaram efeito positivo significativo a partir da segunda batelada e a variável alginato apresentou efeito negativo somente na segunda. Baseando-se

nos resultados desse planejamento experimental, foi elaborado um DCCR para as três variáveis estatisticamente significativas ($p \leq 0,1$) alginato, TG e CaCl_2 .

Tabela 11. Resultados dos efeitos, desvio padrão e limites de confiança do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} da conversão de sacarose em isomaltulose estudado por seis bateladas (a, b, c, d, e, f) de 24 horas individualmente.

Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	72,53	0,28	72,05	73,02
Massa Celular	-0,40	0,60	-1,46	0,67
(a) Alginato	0,45	0,61	-0,63	1,54
Gelatina	-0,12	0,60	-1,19	0,95
TG*	-1,87	0,60	-2,94	-0,80
CaCl_2	-0,24	0,61	-1,32	0,85

Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	68,47	0,52	67,55	69,39
Massa Celular*	2,72	1,14	0,71	4,73
(b) Alginato*	-2,21	1,15	-4,25	-0,17
Gelatina	0,21	1,14	-1,80	2,23
TG*	6,00	1,14	3,99	8,01
CaCl_2^*	1,84	1,15	-0,20	3,89

Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	56,07	2,04	52,46	59,69
Massa Celular	3,81	4,46	-4,09	11,71
(c) Alginato	-0,38	4,53	-8,40	7,65
Gelatina	-0,55	4,46	-8,45	7,35
TG*	15,61	4,46	7,71	23,52
CaCl_2^*	17,01	4,53	8,99	25,04

	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
	Média*	43,43	2,42	39,15	47,71
	Massa Celular	3,55	5,28	-5,80	12,90
(d)	Alginato	1,08	5,36	-8,42	10,57
	Gelatina	-2,47	5,28	-11,82	6,88
	TG*	22,05	5,28	12,70	31,40
	CaCl₂*	24,14	5,36	14,64	33,64

	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
	Média*	31,74	2,27	27,73	35,76
	Massa Celular	5,25	4,95	-3,53	14,02
(e)	Alginato	-0,46	5,03	-9,37	8,45
	Gelatina	-4,08	4,95	-12,85	4,69
	TG*	21,49	4,95	12,72	30,27
	CaCl₂*	24,27	5,03	15,35	33,18

	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
	Média*	22,59	2,08	18,91	26,28
	Massa Celular*	7,37	4,55	-0,69	15,42
(f)	Alginato	-5,59	4,62	-13,77	2,59
	Gelatina	-3,02	4,55	-11,07	5,04
	TG*	19,26	4,55	11,21	27,32
	CaCl₂*	16,03	4,62	7,85	24,21

***parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)**

A variável massa celular apresentou efeito significativo em duas das seis bateladas estudadas, entretanto, optou-se por fixar essa variável no valor do nível intermediário (30%) para o próximo planejamento experimental seqüencial. A variável gelatina, não apresentou efeito significativo em nenhuma das seis bateladas estudadas. Optou-se, portanto, em fixar a concentração de gelatina no

nível mínimo estudado (0,5%) para os experimentos do segundo planejamento experimental.

4.2.2.2 Delineamento composto central rotacional DCCR 2³ para estudo dos efeitos do alginato, TG e CaCl₂ na imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

A Tabela 12 apresenta as variáveis independentes e os valores de seus níveis decodificados utilizados neste planejamento experimental DCCR 2³. As concentrações das variáveis testadas foram na faixa de 1,5-3,5% de alginato, 0,032-0,368 mol/L de CaCl₂ e 0-1,0% de TG.

Tabela 12. Valores decodificados dos níveis utilizados para as variáveis do planejamento experimental DCCR-2³ para a otimização dos componentes da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.

Variáveis	Níveis				
	-α	-1	0	1	α
% Alginato (m:v)	1,5	1,9	2,5	3,1	3,5
CaCl ₂ (mol/L)	0,032	0,1	0,2	0,3	0,368
% TG (m:v)	0	0,2	0,5	0,8	1,0

A Tabela 13 ilustra os resultados experimentais e os valores codificados das variáveis estudadas no DCCR-2³ para o estudo da otimização da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em

isomaltulose para cada uma das quatro bateladas de 24 horas e a média desses valores para cada ensaio. Foram realizados 18 ensaios, sendo 8 referentes ao fatorial 2^3 , 6 referentes aos pontos axiais e 4 ensaios referentes ao ponto central.

A Tabela 13 e Figura 11 ilustram que foram obtidos melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose nos ensaios 9 e 14, sendo obtidos 79,24 e 79,0% na primeira batelada e 33,63 e 46,65%, na quarta batelada respectivamente. O ensaio 14 apresentou a melhor média (68,4%) entre as 4 bateladas estudadas. O ensaio 9 (média igual a 63,5%) foi elaborado com todos os parâmetros no nível +1 (3,1% de alginato de sódio, 0,3mol/L de CaCl_2 , 0,8% de TG), enquanto o ensaio 14 foi elaborado com os parâmetros alginato e cloreto de cálcio no nível central (2,5% e 0,2mol/L respectivamente) e TG no nível + α (1,0%). O que sugere o efeito positivo da TG indicando que melhores resultados podem ser alcançados em concentração de TG igual ou superior a 1,0% (valor do nível + α).

Tabela 13. Planejamento experimental DCCR-2³ codificado para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, cloreto de cálcio e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.

Ensaio	Alginato	CaCl ₂	TG	% de Isomaltulose				MÉDIA
				Batelada 1	Batelada 2	batelada 3	batelada 4	
1	-1	-1	-1	78,68	69,25	34,48	10,33	48,19
2	1	-1	-1	80,25	71,01	37,50	11,20	49,99
3	-1	1	-1	79,40	74,44	33,58	9,97	49,35
4	1	1	-1	77,28	66,94	20,88	4,51	42,40
5	-1	-1	1	76,96	77,94	65,94	33,84	63,67
6	1	-1	1	76,49	75,76	19,38	33,72	51,34
7	-1	1	1	79,33	75,40	59,55	22,52	59,20
8	1	1	1	76,96	77,52	59,35	25,10	59,73
9	-α	0	0	79,24	76,01	65,22	33,63	63,53
10	α	0	0	80,28	74,06	51,27	16,47	55,52
11	0	-α	0	79,35	62,19	19,27	4,52	41,33
12	0	α	0	79,98	45,51	10,75	1,73	34,49
13	0	0	-α	79,43	72,29	31,61	7,30	47,66
14	0	0	α	79,00	75,93	71,90	46,65	68,37
15	0	0	0	79,71	77,23	68,94	36,43	65,58
16	0	0	0	79,02	73,52	60,54	25,76	59,71
17	0	0	0	76,34	76,71	59,85	22,02	58,73
18	0	0	0	76,77	77,51	61,60	25,26	60,29

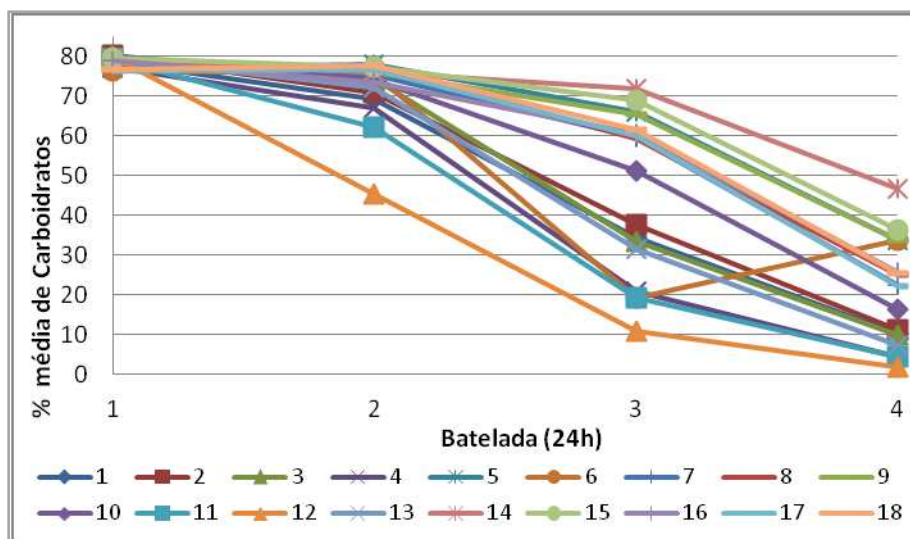


Figura 11. Conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* ATCC 15928 dos 18 ensaios do segundo planejamento experimental DCCR-2³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização celular.

A Figura 12 mostra a média dos resultados das quatro bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose no planejamento DCCR-2³. O ensaio 14 (alginato 2,5%, CaCl₂ 0,2mol/L, TG 1,5%) apresentou a maior média de conversão de sacarose em isomaltulose (68,37% de isomaltulose e 7,84% de trealulose), sendo que, a maior média de conversão de sacarose em trealulose foi obtida no ensaio 6 (alginato 3,1%, CaCl₂ 0,1mol/L, TG 0,8%) com 10,29% de trealulose e 51,34% de isomaltulose. O ensaio 12 (alginato 2,5%, CaCl₂ 0,368mol/L, TG 0,5%) apresentou a menor média de conversão com 34,49% de isomaltulose e 3,14% de trealulose.

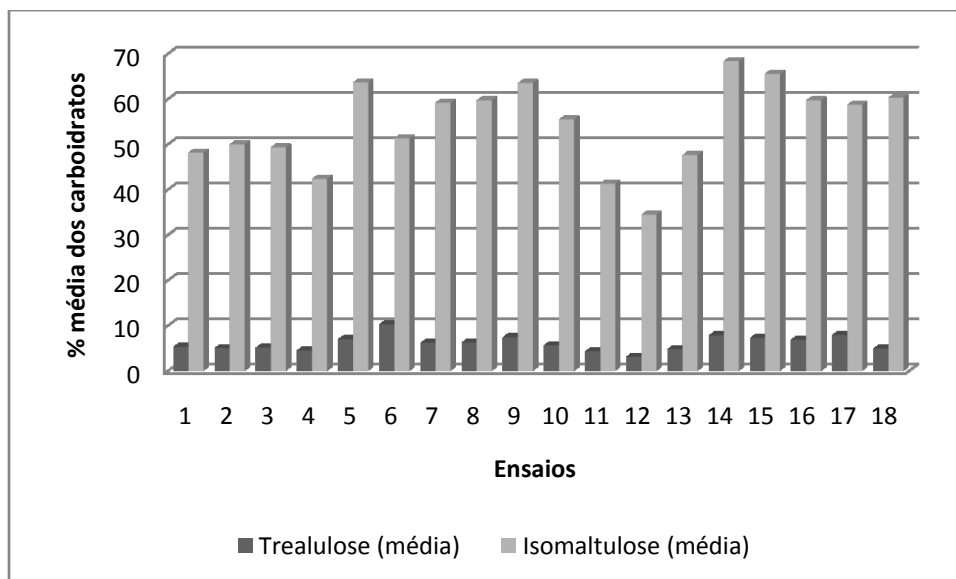


Figura 12. Valores médios das quatro bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose dos 18 ensaios do planejamento experimental DCCR-2³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização de *S. plymuthica*.

Os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança dos resultados do planejamento experimental DCCR-2³, para estudo de imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose estão apresentados na Tabela 14. Os coeficientes de regressão foram estimados com alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,93$). O coeficiente de determinação (R^2) indica a adequação das respostas observadas às variáveis experimentais e suas interações. Em um modelo bem ajustado, as respostas previstas devem estar próximas das respostas observadas, ou seja, quanto mais próximo de 1,0 estiver o valor do coeficiente de determinação, melhor será o ajuste do modelo em relação às respostas observadas.

Tabela 14. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	60,99	1,83	57,59	64,40
(1)Alginato (L)*	-2,23	0,99	-4,07	-0,38
Alginato (Q)	-0,17	1,03	-2,09	1,74
(2)CaCl ₂ (L)	-1,03	0,99	-2,87	0,82
CaCl ₂ (Q)*	-7,81	1,03	-9,73	-5,90
(3)TG (L)*	5,77	0,99	3,93	7,62
TG (Q)	-0,71	1,03	-2,63	1,21
1L X 2L	0,51	1,30	-1,90	2,93
1L X 3L	-0,83	1,30	-3,24	1,58
2L X 3L*	1,29	1,30	-1,12	3,71

*parâmetros estatisticamente significativos (90% de confiança);

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático.

A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA, os resultados estão expressos na Tabela 15. Neste planejamento o valor-F experimental foi 23,5 vezes maior do que o valor-F tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança ($p < 0,1$).

Tabela 15. Análise de variância do segundo planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24h.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	1365,27	3	455,09	59,19
Resíduo	107,64	14	7,69	
Falta de ajuste	79,38	11		
Erro puro	28,27	3		
Total	1472,91	17		

Coeficiente de determinação: R²=0,93, Valor-F tabelado_{0,90;3;14}=2,52

Após as análises, foi possível obter a Equação 2, que representa o modelo codificado:

$$y = 60,99 - 2,23x_1 - 7,81x_2^2 + 5,77x_3 + 1,29x_2x_3 \quad [Equação 2]$$

Onde y é a porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose, x₁ é a concentração de alginato, x₂ é concentração de CaCl₂ e x₃ é a concentração de TG. A partir da Equação 2, pode-se calcular o valor predito de conversão de sacarose em isomaltulose para cada ensaio e verificar o erro de ajuste e o erro relativo (Tabela 16). Observou-se que os erros relativos foram baixos, com exceção dos menores valores de conversão, o que indica que o modelo não apresenta um bom ajuste nestes pontos, entretanto nesta otimização busca-se os pontos de máximo, onde o erro relativo apresenta baixos valores, portanto, o modelo pode ser considerado bem ajustado.

Tabela 16. Valores da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose experimentais e previstas pelo modelo e desvios para o planejamento experimental DCCR-2³ para estudo dos efeitos das variáveis alginato de sódio, CaCl₂ e TG na imobilização de células de *S. plymuthica*.

Ensaio	% Isomaltulose experimental	% Isomaltulose prevista	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	48,19	50,93	-2,74	-5,69
2	49,99	46,47	3,52	7,04
3	49,35	48,35	1,00	2,02
4	42,40	43,89	-1,49	-3,51
5	63,67	59,89	3,78	5,93
6	51,34	55,43	-4,09	-7,97
7	59,20	62,47	-3,27	-5,53
8	59,73	58,01	1,72	2,88
9	63,53	64,74	-1,21	-1,90
10	55,52	57,24	-1,72	-3,10
11	41,33	38,95	2,39	5,78
12	34,49	38,95	-4,46	-12,92
13	47,66	51,30	-3,64	-7,64
14	68,37	70,68	-2,32	-3,39
15	65,58	60,99	4,59	6,99
16	59,71	60,99	-1,28	-2,14
17	58,73	60,99	-2,26	-3,85
18	60,29	60,99	-0,70	-1,17

As superfícies de resposta e as curvas de contorno estão representadas na Figura 13. Pode-se observar que houve uma inflexão da curva no eixo da variável cloreto de cálcio, indicando valor ótimo desse parâmetro entre 0,1 e 0,3 mol/L e que haveria um incremento na conversão de sacarose em isomaltulose em concentrações de alginato inferiores ao nível mínimo estudado (1,5%) e em concentrações de TG superiores ao nível máximo estudado (1,0%).

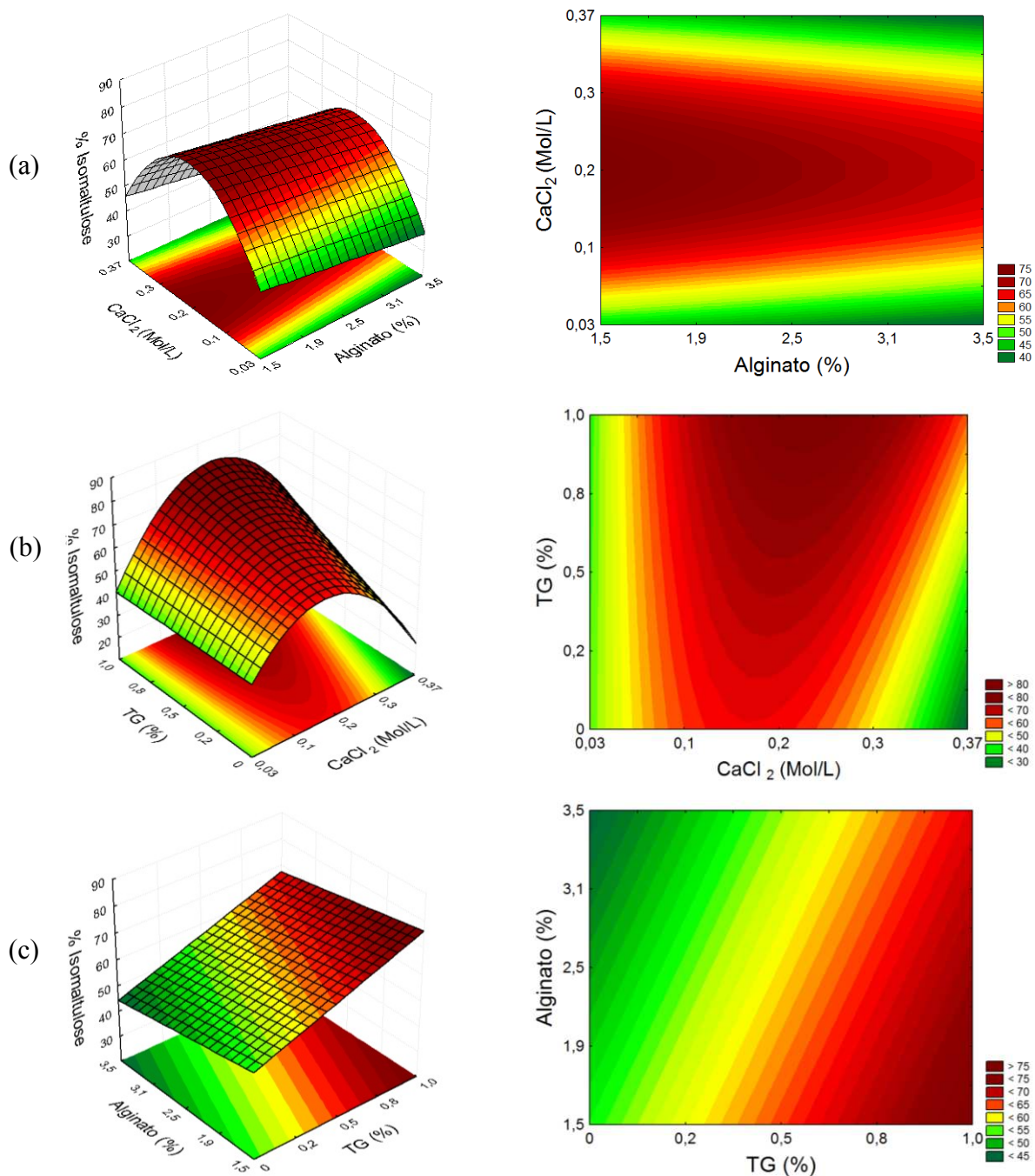


Figura 13. Superfície de resposta e curva de contorno dos efeitos do CaCl_2 , alginato de sódio e TG na imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2³).

- (a) Efeito do Cloreto de Cálcio e Alginato de sódio;
- (b) Efeito do Cloreto de Cálcio e Transglutaminase;
- (c) Efeito do Alginato e Transglutaminase.

A partir dos resultados obtidos neste planejamento, foi elaborado outro (DCCR-2²) com duas variáveis. A variável CaCl₂ foi fixada em seu ótimo 0,25mol/L e a variável alginato fixada em 1,7%, pois apesar de os resultados do planejamento indicarem que a redução da concentração para níveis inferiores a 1,5% representaria aumento na capacidade de conversão de sacarose em isomaltulose, na prática, observou-se que esses valores não eram possíveis, visto que, já na concentração de 1,5% de alginato, este apresentou dificuldade de gelificação e impossibilidade de formação de esferas uniformes. Para este planejamento, optou-se por estudar novamente a variável massa celular em níveis ajustados segundo indicação dos efeitos observados no primeiro planejamento.

4.2.2.3 Delineamento composto central rotacional DCCR 2² para estudo do efeito da concentração de TG e MC na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

O planejamento experimental DCCR-2², para estudo dos efeitos da concentração de massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica*, ATCC 15928 em matriz de alginato de cálcio-gelatina e conversão de sacarose em isomaltulose foi realizado como descrito no item 3.3.2.3. A Tabela 17 apresenta as variáveis e os valores de seus níveis decodificados utilizados neste planejamento experimental. As concentrações das variáveis testadas foram de 25-35% de massa celular e 1,8-3,8% de transglutaminase.

Tabela 17. Valores decodificados dos níveis utilizados para as variáveis MC e TG do planejamento experimental (DCCR-2²) para a otimização da imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Massa Celular (%)	25	26,5	30	33,5	35
TG (%)	1,8	2,1	2,8	3,5	3,8

A Tabela 18 ilustra os resultados experimentais e os valores codificados das variáveis (massa celular e TG) estudadas no DCCR-2² para o estudo da otimização da matriz de imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose para cada uma das quatro bateladas de 24 horas estudadas e a média desses valores para cada ensaio. Foram realizados 12 ensaios, sendo 4 referentes ao fatorial 2², 4 referentes aos pontos axiais e 4 ensaios referentes ao ponto central.

Considerando-se o valor médio de conversão de sacarose em isomaltulose (71,04%) durante quatro bateladas de 24 horas foram obtidos melhores resultados no ensaio 4, no qual foram obtidos 75,82% de isomaltulose na primeira batelada e 61,81% na quarta batelada (Tabela 18, Figuras 14 e 15). No ensaio 4 foram utilizados os parâmetros concentração de massa celular e transglutaminase no nível +1 (33,5% e 3,5%), respectivamente.

Tabela 18. Planejamento experimental DCCR-2² codificado para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas.

Ensaio	Massa celular	TG	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4	MÉDIA
			% de conversão de sacarose em isomaltulose				
1	-1	-1	79,49	58,21	53,70	22,48	53,47
2	1	-1	61,12	70,86	58,98	29,60	55,14
3	-1	1	77,51	65,59	66,63	36,84	61,64
4	1	1	75,82	73,04	73,50	61,81	71,04
5	-α	0	67,04	66,58	61,51	32,61	56,93
6	α	0	72,00	72,95	69,33	36,43	62,68
7	0	-α	61,23	59,99	60,66	26,09	51,99
8	0	α	66,86	71,97	63,55	36,06	59,61
9	0	0	76,89	73,61	65,11	42,07	64,42
10	0	0	72,67	69,84	69,03	49,39	65,23
11	0	0	72,15	71,51	64,47	46,87	63,75
12	0	0	63,98	76,48	64,97	42,59	62,01

As Figuras 14 e 15 ilustram que nos ensaios do planejamento experimental DCCR-2² foram obtidas maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose durante as quatro bateladas de 24 horas e, portanto, maior estabilidade em comparação com resultados do planejamento experimental anterior (Figuras 10 e 11). Observou-se também que as variações entre os resultados dos ensaios apresentaram menor diferença, dentro dos níveis estudados neste planejamento.

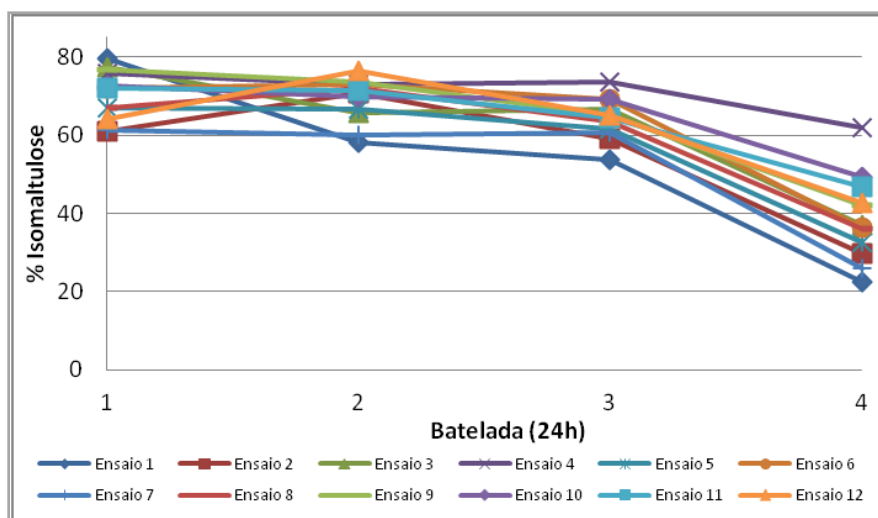


Figura 14. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 12 ensaios do planejamento experimental DCCR-2² para estudo dos efeitos da concentração de massa celular e transglutaminase na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

A Figura 15 mostra a média dos resultados das quatro bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose no DCCR-2². O ensaio 4 (MC 33,5% e TG 3,5%) apresentou a maior média de conversão de sacarose em isomaltulose, com 71,04% de isomaltulose e 6,20% de trealulose, sendo que, a maior média de conversão de sacarose em trealulose foi obtida no ensaio 5 (massa celular 25% e TG 2,8%) com 56,93% de isomaltulose e 7,43% de trealulose. O ensaio 7 (massa celular 30% e TG 1,8%) apresentou a menor média de conversão de sacarose em isomaltulose sendo obtido 52,00% de isomaltulose e 7,32% de trealulose.

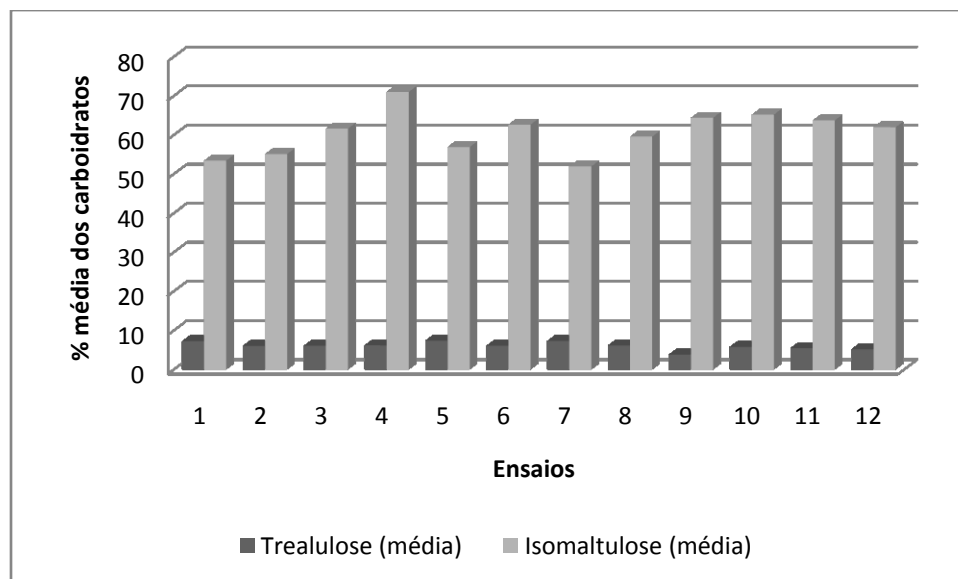


Figura 15. Conversão média entre as 4 bateladas de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 12 ensaios do planejamento experimental DCCR-2² para estudo dos efeitos da concentração de massa celular e da TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

Tabela 19. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental (DCCR-2²) para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* com alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança - 90%	Limite de Confiança +90%
Média*	63,84	1,32	61,28	66,40
(1)Massa Celular (L)*	2,40	0,93	0,59	4,22
Massa Celular(Q)	-1,39	1,05	-3,42	0,64
(2)TG (L)*	4,37	0,93	2,55	6,18
TG (Q)*	-3,40	1,05	-5,43	-1,37
1L by 2L	1,93	1,32	-0,63	4,49

*parâmetros estatisticamente significativos (90% de confiança);

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático.

Os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *S. plymuthica* imobilizadas estão apresentados na Tabela 19. Os coeficientes de regressão foram estimados com uma variação explicada de 80% ($R^2 = 0,80$) podendo ser considerado um bom valor para ensaios biológicos. A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA, e os resultados estão expressos na Tabela 20. O valor-F experimental foi 3,5 vezes maior do que o valor-F tabelado, indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança ($p < 0,1$).

Tabela 20. Análise de variância do planejamento experimental (DCCR-2²) para estudo dos efeitos das variáveis concentração da massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose considerando-se a média das quatro bateladas de 24 horas.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	262,66	3	87,55	10,18
Resíduo	68,80	8	8,60	
Falta de ajuste	63,17	5		
Erro puro	5,64	3		
Total	331,46	11		

Coeficiente de determinação: $R^2=0,80$, Valor-F_{tabelado}_{0,90;3;8}=2,92

Após as análises, foi possível obter a Equação 3, que representa o modelo codificado:

$$y = 63,84 + 2,40x_1 + 4,37x_2 - 3,40x_2^2 \quad [\text{Equação 3}]$$

Onde y é a porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose, x_1 é concentração de massa celular e x_2 é concentração de TG. A partir da Equação 3, pode-se calcular o valor predito de conversão de sacarose em isomaltulose para cada ensaio e verificar o erro de ajuste e o erro relativo como é apresentado na Tabela 21. Pode-se observar que os erros relativos foram baixos, o que indica que o modelo apresenta um bom ajuste.

Tabela 21. Valores (média de 4 bateladas) da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose experimentais, previstos pelo modelo e desvios para o planejamento experimental DCCR-2² para o estudo dos efeitos das variáveis concentração de massa celular e TG na imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

Ensaio	% média de Isomaltulose experimental	% média de Isomaltulose prevista	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	53,47	53,67	-0,20	-0,37
2	55,14	58,47	-3,33	-6,04
3	61,64	62,41	-0,77	-1,24
4	71,04	67,21	3,83	5,39
5	56,93	60,46	-3,52	-6,18
6	62,68	67,22	-4,55	-7,26
7	51,99	50,92	1,07	2,07
8	59,61	63,24	-3,63	-6,09
9	64,42	63,84	0,58	0,90
10	65,23	63,84	1,39	2,13
11	63,75	63,84	-0,09	-0,14
12	62,01	63,84	-1,83	-2,96

A superfície de resposta e as curvas de contorno do DCCR-2² com as variáveis concentração de massa celular e transglutaminase para a imobilização de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose, ilustradas na Figura 16 indicam que a concentração ótima da TG seria em torno de 3,5% e que haveria um aumento na produção de isomaltulose utilizando-se concentrações de massa celular superiores ao nível máximo estudado (35%).

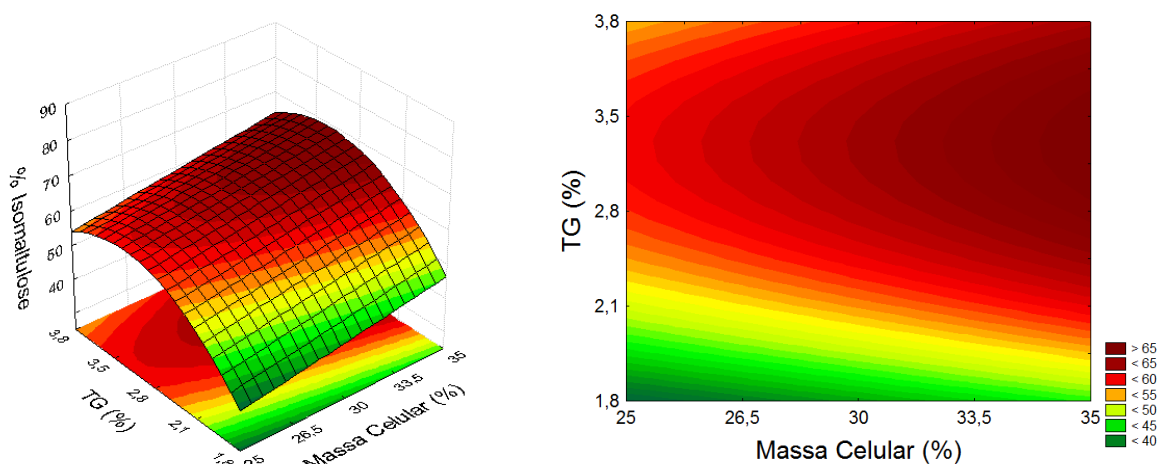


Figura 16. Superfície de resposta e curva de contorno dos efeitos das variáveis concentração de massa celular e da TG na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e conversão da sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2²).

KAWAGUTI, 2007 imobilizou células íntegras de *Erwinia sp* D12 (40% de massa celular) na proporção 1:2 com solução contendo 2% de alginato de sódio Synth[®], 0,1% de Tween 80 por gotejamento em 2% de CaCl₂. As células imobilizadas foram tratadas com glutaraldeído 0,06%. Foi obtida conversão

máxima de 72,27% de solução 35% de sacarose em isomaltulose por processo em batelada nas primeiras 12 horas.

ORSI, (2008) estudou a conversão de sacarose em isomaltulose por células íntegras de *S. plymuthica* ATCC 15928 (30% de solução de massa celular úmida) imobilizadas em mistura de alginato de sódio Synth[®] 2%, e alginato de sódio Sigma de alta viscosidade 1% em CaCl₂ 2%. Os grânulos de células imobilizadas foram tratados com glutaraldeído 0,06% e empacotados em biorreatores. As células imobilizadas converteram cerca de 64% da solução 35% de sacarose em isomaltulose durante 15 dias a 25°C.

A composição da matriz de imobilização otimizada no presente trabalho, utilizando planejamento experimental seqüencial, foi 1,7% (m:v) de alginato de sódio 14.000cP Sigma[®]-A7128, 0,5% (m:v) de gelatina, 0,25mol/L CaCl₂ (componentes esterilizados por processo de autoclavagem a 121°C por 15 minutos) e 3,5% de TG (m:v), 33,5% (m:v) de massa celular úmida de *S. plymuthica*. Essas condições foram testadas em processo contínuo e os resultados estão apresentados no item 4.2.4 (página 116)

Este resultado demonstra a viabilidade em se aplicar a enzima transglutaminase e gelatina para promover ligações cruzadas em substituição a compostos tóxicos como glutaraldeído, alternativa inviável para produtos destinados ao consumo humano (PATIL et al., 2010). As taxas de conversão de sacarose em isomaltulose aqui apresentadas são equivalentes ou superiores às anteriormente descritas na literatura com a adição de glutaraldeído.

4.2.3 Estudo da imobilização das células de *S. plymuthica* em matriz de alginato de cálcio, pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP), TG e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose

4.2.3.1 Caracterização da pectina de baixo teor de metoxilação amidada (ALMP)

Os materiais e procedimentos empregados para a obtenção dos resultados abaixo estão descritos no item 3.3.3.1.

A ALMP Danisco® apresentou $83,6\% \pm 1,5$ de ácido galacturônico, o que a coloca dentro do limite de 65% estipulado pela FAO (1994) para pectinas comerciais. O grau de esterificação apresentado foi de $36,9 \pm 0,7$ sendo classificada como pectina de baixo teor de esterificação por apresentar menos de 50% dos grupos carboxílicos esterificados (TURQUOIS, *et al.*, 1999) e o grau de amidação de $10,0 \pm 0,4$ indicando que 10% dos grupos carboxilas são amidados.

4.2.3.2 Otimização das condições de imobilização das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em matriz de alginato de sódio, ALMP, TG e gelatina para a conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose em processo por bateladas.

Foram elaborados dois planejamentos experimentais sequenciais para a otimização das condições de imobilização das células de *S. plymuthica* em matriz de alginato de sódio, ALMP, TG e gelatina, para a conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada, segundo metodologia descrita no item 3.3.3.2.

4.2.3.2.1 Estudo dos efeitos das variáveis alginato, MC, gelatina, ALMP, CaCl_2 , TG na imobilização de células de *S. plymuthica* por metodologia de planejamento experimental Plakett-Burman-12 (PB-12).

A Tabela 22 mostra os valores decodificados dos níveis utilizados no planejamento experimental PB-12 para a otimização da composição da matriz de imobilização das células de *S. plymuthica*, e conversão de sacarose em isomaltulose, enquanto que a Tabela 23 ilustra os níveis de cada parâmetro empregados na elaboração dos 16 ensaios.

Tabela 22. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis MC, alginato, gelatina, ALMP, CaCl_2 , TG do planejamento experimental Plackett-Burman–12 para a otimização da composição da matriz de imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
%MC (m:m)	20	27,5	35
%Alginato (m:v)	1,5	2	2,5
%Gelatina (m:v)	0	1	2
%ALMP (m:v)	0	1	2
CaCl_2 (mol/L)	0,1	0,25	0,4
%TG (m:v)	2	3	4

A Tabela 23 mostra os níveis de cada parâmetro empregados na elaboração dos 16 ensaios. A Tabela 24 e a Figura 17 ilustram os resultados obtidos em cada um dos ensaios para as cinco bateladas estudadas e a média dos resultados. Pode-se observar que a melhor média de resultados foi obtida no ensaio 10 (79,4%). No ensaio número 10 foi obtido um aumento de 31% na taxa de conversão de sacarose em isomaltulose comparado com a média do ensaio número 8 (60,7%) que apresentou menor valor de conversão do açúcar. Pode-se observar na Figura 17 a tendência de estabilidade de conversão de sacarose em isomaltulose onde boa parte dos ensaios (ensaios 1, 4, 6, 10, 11 e 13) manteve taxas de conversão entre 85 e 68,7% durante as 5 bateladas estudadas.

Tabela 23. Planejamento Plackett-Burman – 12 codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de MC, alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Ensaio	MC	Alginato	Gelatina	ALMP	CaCl_2	TG
1	1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	1	1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0

Tabela 24. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante cinco bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos nos 16 ensaios do planejamento Plackett-Burman – 12 para estudo do efeito da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.

Ensaio	batelada 1	batelada 2	batelada 3	batelada 4	batelada 5	MÉDIA
% de conversão de sacarose em isomaltulose						
1	76,2	77,3	77,3	74,5	78,8	76,8
2	81,0	71,9	73,2	56,8	68,3	70,3
3	77,2	67,3	66,3	54,2	80,1	69,0
4	81,6	76,5	76,8	70,7	68,7	74,9
5	74,6	68,1	71,2	54,9	68,0	67,4
6	79,5	76,7	74,8	68,7	70,8	74,1
7	78,7	70,2	71,8	57,8	64,6	68,6
8	70,4	66,1	66,3	55,6	45,3	60,7
9	73,7	67,9	70,3	57,6	62,4	66,4
10	79,4	74,8	80,3	78,2	84,4	79,4
11	78,5	74,2	76,4	70,8	74,2	74,8
12	81,1	77,2	74,6	57,2	69,8	72,0
13	80,5	74,0	78,6	68,7	71,7	74,7
14	79,5	72,8	73,1	61,7	75,4	72,5
15	79,0	73,5	72,1	60,4	68,9	70,8
16	79,1	72,6	72,7	80,2	70,2	75,0

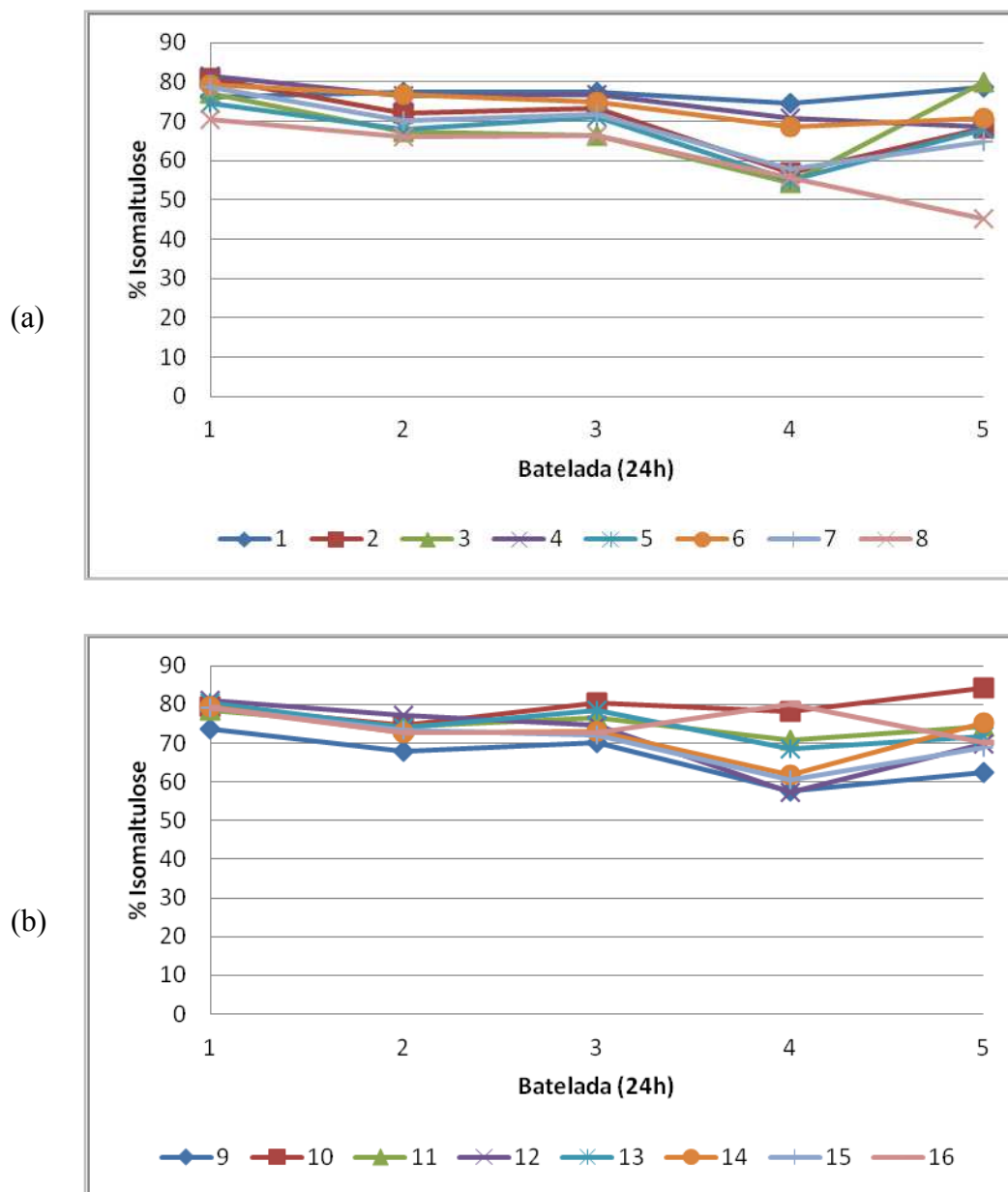


Figura 17. Conversão de sacarose em isomaltulose obtida nos 16 ensaios do planejamento PB- 12 durante cinco bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica*.

(a) ensaios de 1 a 8; (b) ensaios de 9 a 16.

A Figura 18 mostra a média dos resultados das cinco bateladas de conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose do planejamento PB-12. O ensaio 10 apresentou a maior média de conversão com 79,4% de isomaltulose e 7,9% de trealulose e o ensaio 8 apresentou a menor média de conversão com 60,7% de isomaltulose e 5,9% de trealulose. Observou-se que todos os ensaios propostos nesse planejamento atingiram níveis de conversão de sacarose em isomaltulose entre 60 e 79% sendo consideradas altas taxas em relação aos estudos anteriores apresentados neste trabalho.

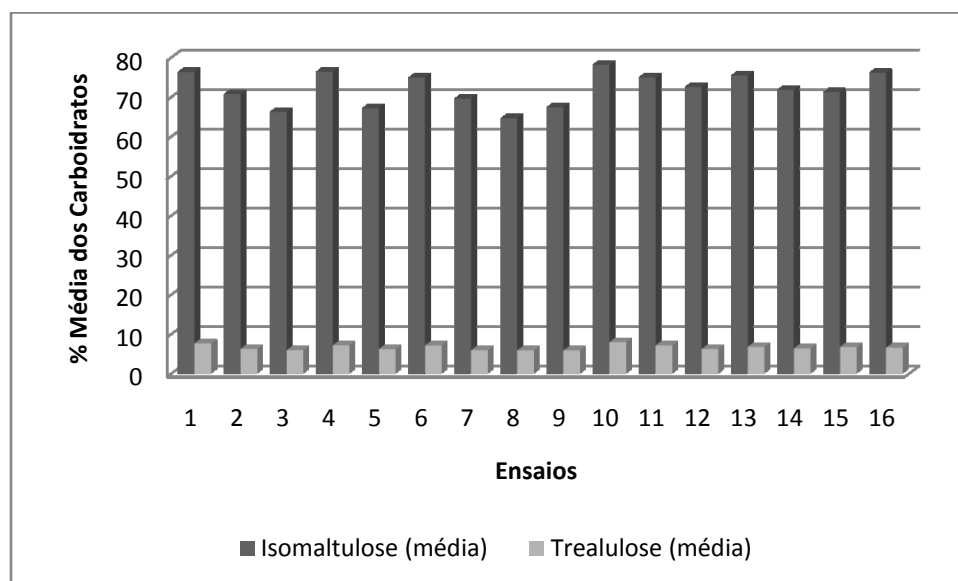


Figura 18. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidas nos 16 ensaios do planejamento Plackett-Burman–12 para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, massa celular, alginato, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 por 5 bateladas de 24h.

A Tabela 25 ilustra os resultados dos efeitos dos parâmetros em cada batelada, assim como o desvio padrão e os limites de confiança ao nível de significância de 90% ($p \leq 0,1$). Pode-se observar que o único parâmetro significativo na primeira batelada foi o CaCl_2 , apresentando efeito negativo, nas bateladas seguintes mais parâmetros passaram a ser significativos, sendo que os parâmetros massa celular e TG apresentaram efeito positivo e os parâmetros alginato e ALMP apresentaram efeito negativo. Apesar do parâmetro alginato apresentar efeito negativo na quarta e positivo na quinta batelada, estes não foram considerados significativos ($p \leq 0,1$). O único parâmetro que não apresentou efeito significativo ($p \leq 0,1$) foi a gelatina.

Tabela 25. Resultados dos efeitos, desvio padrão e limites de confiança do planejamento fatorial Plackett-Burman-12 para estudo dos efeitos da concentração de MC, alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl_2 na imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose estudado por cinco bateladas (a, b, c, d, e) de 24 horas individualmente.

	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
(a)	Média*	78,12363	0,627109	76,70501	79,54225
	Massa Celular	2,09858	1,448247	-1,17758	5,37475
	Alginato	1,16863	1,448247	-2,10754	4,44479
	Gelatina	-0,80320	1,448247	-4,07936	2,47296
	ALMP	-1,98838	1,448247	-5,26455	1,28778
	CaCl_2^*	-3,70911	1,448247	-6,98527	-0,43295
	TG	1,79658	1,448247	-1,47958	5,07274
	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
(b)	Média*	72,57034	0,382276	71,70557	73,43511
	Massa Celular*	3,73410	0,882828	1,73700	5,73119
	Alginato*	-1,93002	0,882828	-3,92711	0,06708
	Gelatina	0,00763	0,882828	-1,98946	2,00473
	ALMP*	-4,44585	0,882828	-6,44295	-2,44876
	CaCl_2^*	-4,38717	0,882828	-6,38426	-2,39007
	TG*	2,05944	0,882828	0,06234	4,05653

	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
(c)	Média*	73,48733	0,495356	72,36676	74,60790
	Massa Celular*	4,65182	1,143976	2,06397	7,23968
	Alginato	-1,96617	1,143976	-4,55402	0,62168
	Gelatina	-2,11838	1,143976	-4,70624	0,46947
	ALMP*	-3,34558	1,143976	-5,93343	-0,75772
	CaCl₂*	-3,49670	1,143976	-6,08455	-0,90884
	TG*	3,59101	1,143976	1,00316	6,17886
	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
(d)	Média*	64,26805	1,677393	60,4735	68,06257
	Massa Celular*	8,41188	3,873774	-0,3512	17,17497
	Alginato	-5,07388	3,873774	-13,8370	3,68921
	Gelatina	0,96659	3,873774	-7,7965	9,72968
	ALMP*	-8,38305	3,873774	-17,1461	0,38004
	CaCl₂	-3,09806	3,873774	-11,8611	5,66503
	TG*	8,42506	3,873774	-0,3380	17,18815
	Parâmetro	Efeito	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
(e)	Média*	70,1041	1,588415	67,1923	73,01579
	Massa Celular*	7,0857	3,668288	0,3614	13,81014
	Alginato	2,7706	3,668288	-3,9538	9,49497
	Gelatina	-3,1226	3,668288	-9,8470	3,60180
	ALMP*	-13,4192	3,668288	-20,1436	-6,69480
	CaCl₂	-2,2194	3,668288	-8,9437	4,50504
	TG	2,4690	3,668288	-4,2554	9,19337

Os parâmetros MC e TG apresentaram efeito positivo indicando que concentrações superiores a 35% de MC e superior a 4% de TG resultariam em maior conversão de sacarose em isomaltulose. Contudo na fermentação da linhagem de *S. plymuthica* em fermentador de 6,6L contendo 3L de meio de cultivo otimizado por ORSI (2008) como descrito no item 3.2.1, foi obtido somente cerca de 30 – 32g de MC e não foi possível testar concentrações mais altas de MC nos ensaios de otimização da imobilização celular. Desta forma, no estudo seguinte DCCR 2³ foi fixada a concentração de 38% de MC e testadas TG em maior concentração (5%).

A variável CaCl_2 apresentou efeito negativo ($p \leq 0,1$) nos resultados das três primeiras bateladas, porém nos estudos preliminares verificou-se dificuldade de formação de gel de pectato e alginato de cálcio em concentrações de CaCl_2 inferiores a 0,1Mol/L, por isso optou-se por fixar a concentração dessa variável em 0,1Mol/L nos próximos estudos.

A variável alginato de sódio apresentou efeito significativo ($p \leq 0,1$) apenas na segunda batelada, sendo este negativo na faixa estudada entre 1,5 a 2,5%. Desta forma, para o estudo subsequente optou-se estudar os níveis da variável alginato em concentrações de 0 - 3%, com a finalidade de verificar os resultados da matriz utilizando-se a ALMP sem alginato de sódio, para a imobilização de células de *S. plymuthica* e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose.

O parâmetro gelatina variou entre 0% e 2%. Não foi observado efeito significativo desta variável na faixa de concentração estudada, para o estudo seqüente a faixa de concentração estudada foi ampliada (0-4%).

A variável ALMP apresentou efeito significativo ($p \leq 0,1$) negativo da 2ª até a 5ª batelada, porém o nível inferior (-1) de estudo com concentração 0% desta variável não pode ser diminuído. Visto que o foco do estudo proposto foi a aplicação da ALMP na imobilização das células e suas interações com as outras variáveis optou-se por manter a concentração estudada na faixa de 0 a 2% de pectina nos estudos posteriores.

4.2.3.3 Estudo dos efeitos das variáveis alginato, gelatina, ALMP na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por metodologia de planejamento experimental por delineamento composto central rotacional completo- DCCR 2³.

O DCCR-2³ para estudo dos efeitos das variáveis, concentração de alginato de sódio, gelatina e ALMP na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose foi realizado como descrito no item 3.3.3.2.2, mantendo-se constante a concentração massa celular em 38%, CaCl₂ em 0,1mol/L e TG em 5%. A Tabela 26 mostra os valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis empregadas na elaboração dos 18 ensaios para a otimização das células de *S. plymuthica* enquanto que a Tabela 27 ilustra os níveis de cada parâmetro empregados nos 18 ensaios.

Tabela 26. Valores decodificados dos níveis utilizados das variáveis alginato de sódio, ALMP e gelatina no planejamento experimental DCCR 2³ para a otimização da composição da matriz de imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose.

	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
%Alginato de sódio (m:m)	0	0,6	1,5	2,4	3
%Gelatina (m:v)	0	0,8	2	3,2	4
%ALMP (m:v)	0	0,4	1	1,6	2

A Tabela 28 e Figura 19 ilustram os resultados obtidos em cada um dos ensaios para as quatro bateladas estudadas e a média dos resultados. Pode-se observar que a melhor média de resultados de conversão de sacarose em

isomaltulose (71,8%) foi obtida no ensaio 13. Na Figura 19 observa-se que não houve grande variação entre a maioria dos ensaios indicando que a variação dos parâmetros não promoveu diferença significativa na matriz de imobilização a ponto de influenciar no resultado da conversão de sacarose em isomaltulose, entretanto, todos os ensaios apresentaram taxas de conversão média acima de 57%.

Tabela 27. Planejamento DCCR 2³ codificado com as combinações experimentais para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, gelatina e ALMP na imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928 e conversão de sacarose em isomaltulose por processo em bateladas (24h).

Ensaios	Alginato	Gelatina	ALMP
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Tabela 28. Porcentagem de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas e média dos valores obtidos nos 18 ensaios do planejamento DCCR 2³ para estudo do efeito da concentração de ALMP, alginato e gelatina na imobilização de células de *S. plymuthica* ATCC 15928.

Ensaio	batelada 1	batelada 2	batelada 3	batelada 4	MÉDIA
	% de conversão de sacarose em isomaltulose				
1	80,71	80,74	61,50	31,31	63,57
2	81,36	79,71	72,11	41,61	68,70
3	81,28	79,44	72,84	44,01	69,39
4	81,06	79,37	74,83	39,46	68,68
5	81,26	78,73	51,68	21,51	58,30
6	79,98	79,06	73,19	50,19	70,61
7	79,90	79,24	65,32	34,16	64,65
8	79,75	80,47	72,55	43,46	69,06
9	81,24	77,68	57,01	26,44	60,60
10	80,36	79,78	69,48	30,93	65,14
11	80,43	79,58	67,02	29,19	64,05
12	81,44	79,61	69,91	50,94	70,47
13	81,44	80,77	73,67	51,38	71,81
14	80,77	80,01	72,68	43,41	69,21
15	79,81	80,03	66,27	28,43	63,63
16	80,40	79,93	63,88	33,60	64,45
17	82,00	79,00	67,29	33,10	65,34
18	80,33	77,07	54,07	17,99	57,37

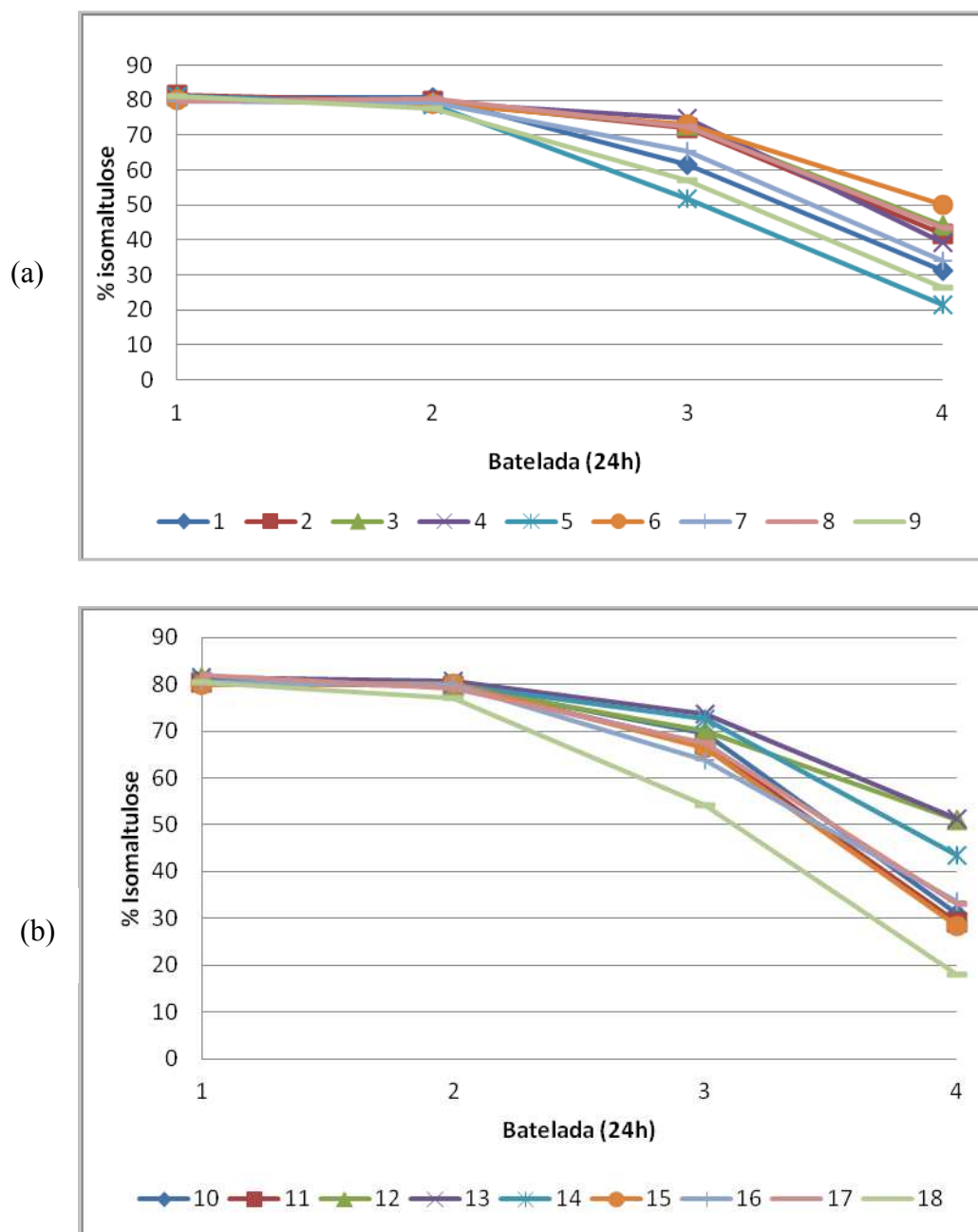


Figura 19. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose obtidos nos 18 ensaios do planejamento DCCR 2³ durante quatro bateladas de 24 horas, para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, alginato e gelatina na imobilização de *S. plymuthica*.

(a) ensaios de 1 a 9; (b) ensaios de 10 a 18.

A Figura 20 mostra a média dos resultados das quatro bateladas de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose e trealulose, do DCCR-2³ para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928. Os ensaios 6, 12 e 13 apresentaram as maiores médias de conversão próximas de 71% de isomaltulose e 7,5% de trealulose e os ensaios 5 e 18 apresentaram as menores médias de conversão ao redor de 48% de isomaltulose e 5,9% de trealulose.

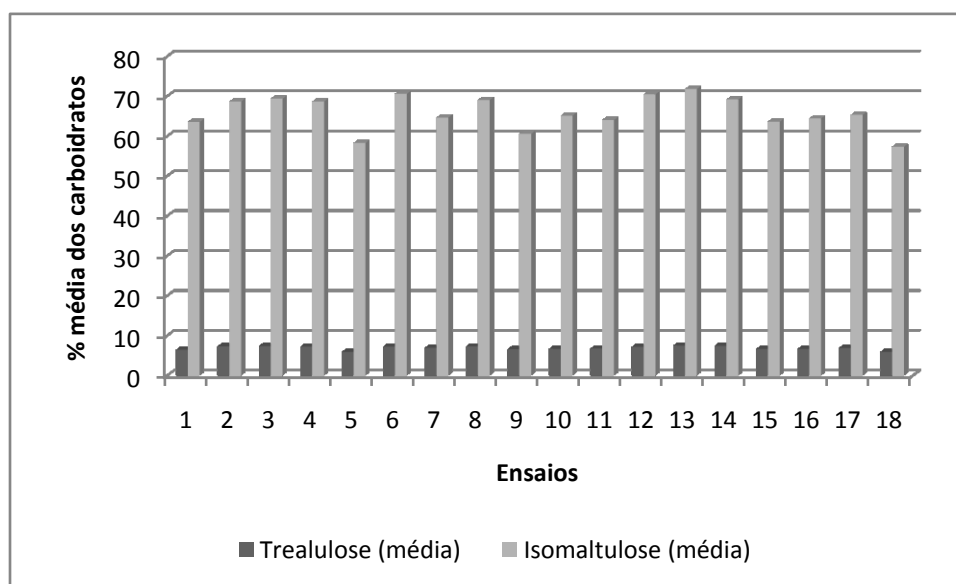


Figura 20. Conversão média de sacarose em isomaltulose e trealulose obtidos nos 18 ensaios do planejamento DCCR-2³ para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.

Os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em alginato, ALMP e gelatina estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança do planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de células de *S. plymuthica*.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	62,72236	1,216141	59,91793	65,52678
(1)Alginato (L)*	2,10703	0,659139	0,58705	3,62700
Alginato (Q)	-0,05024	0,684891	-1,62960	1,52912
(2)Gelatina (L)*	1,56677	0,659139	0,04679	3,08674
Gelatina (Q)*	1,50186	0,684891	-0,07750	3,08122
(3)ALMP (L)	-0,88546	0,659139	-2,40544	0,63451
ALMP (Q)*	2,65091	0,684891	1,07155	4,23027
1L X 2L*	-1,71750	0,861206	-3,70345	0,26845
1L X 3L*	1,53750	0,861206	-0,44845	3,52345
2L X 3L	-0,12500	0,861206	-2,11095	1,86095

*parâmetros estatisticamente significativos (90% de confiança);

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático.

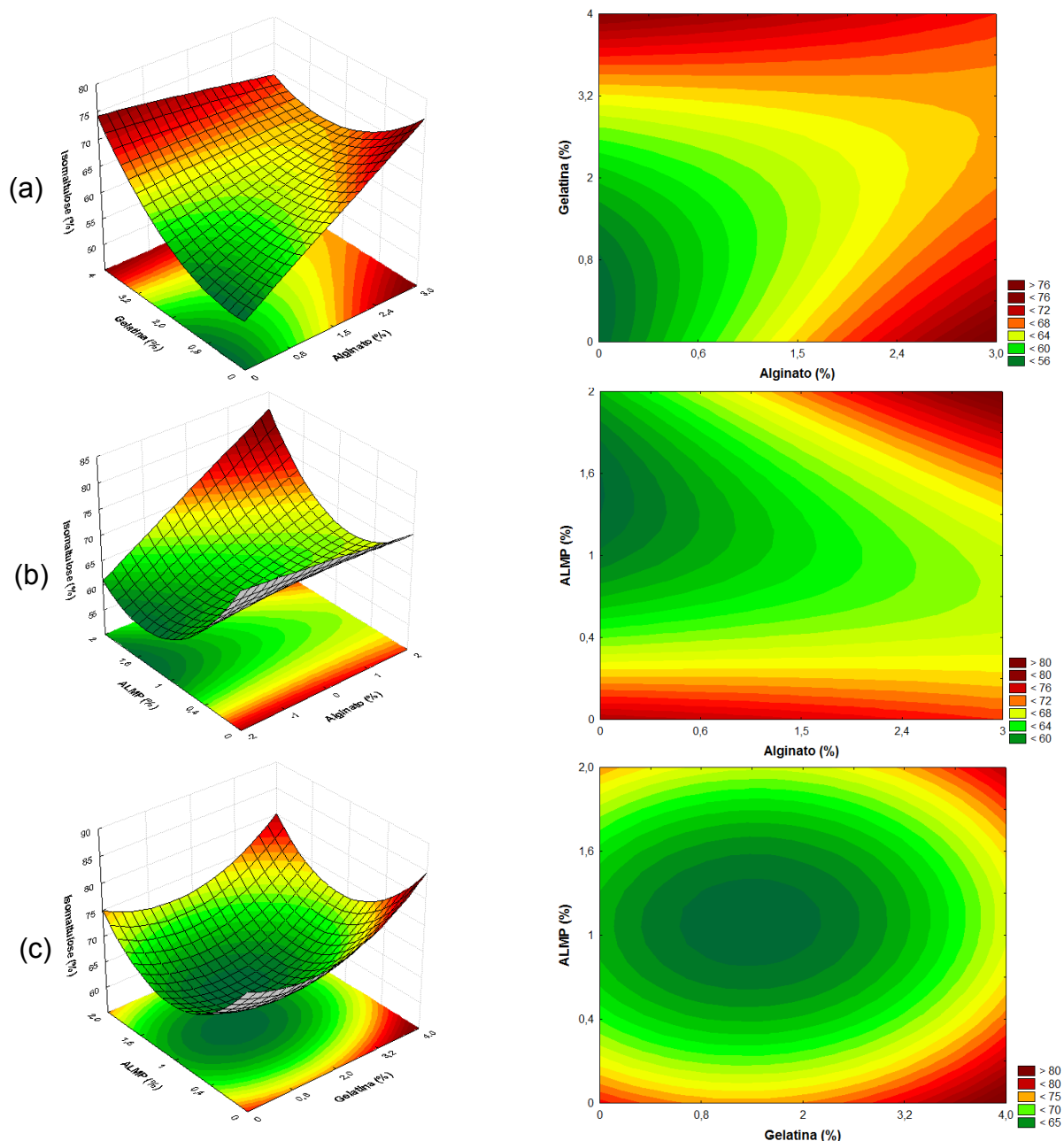
A análise estatística do modelo foi obtida por ANOVA, os resultados estão expressos na Tabela 30. Neste planejamento o valor-F experimental foi maior do que o valor-F tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de nível de confiança ($p < 0,1$).

Tabela 30. Análise de variância do planejamento experimental (DCCR-2³) para estudo dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização de células de *S. plymuthica*.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor-F experimental
Regressão	256,3154	6	42,71923	9,90
Resíduo	47,46729	11	4,315208	
Falta de ajuste	8,1614	8		
Erro puro	39,3059	3		
Total	303,7827	17		

Coeficiente de determinação: $R^2=0,84$, Valor-F_{tabelado}_{0,90;6;11}=2,39

A Figura 21 ilustra a superfície de resposta dos efeitos da concentração de alginato, ALMP e gelatina na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose. Pode-se observar que houve efeito positivo das três variáveis, concentração de alginato de sódio, ALMP e gelatina, indicando que os valores de concentração do nível superior 3%, 2%, 4% respectivamente seriam os pontos mais próximos da otimização dos componentes da matriz de imobilização.



(a) Efeito da gelatina e alginato de sódio; (b) Efeito da ALMP e alginato de sódio; (c) Efeito da ALMP e gelatina

Figura 21. Superfícies de resposta e curvas de contorno dos efeitos da concentração de alginato de sódio, ALMP e gelatina na imobilização de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose dos ensaios do planejamento experimental (DCCR-2³)

4.2.3.4 Testes em triplicatas das melhores concentrações de alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e CaCl_2 obtidas nos dois ensaios anteriores para a imobilização de células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Para avaliar as matrizes de imobilização das células de *S. plymuthica* que apresentaram melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose (entre 70 e 79% de conversão média por 4 bateladas) nos três planejamentos seqüenciais descrito nos itens 4.2.3.3 e 4.2.3.4, foram realizados dois testes com sete ensaios em triplicata, conforme apresentado na Tabela 31 e no item 3.3.3.2.3. Em todos os ensaios a concentração de massa celular foi de 38%.

Tabela 31. Concentrações de alginato de sódio, ALMP, gelatina, TG e cloreto de cálcio utilizados nos sete ensaios do estudo univariável para a imobilização de células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

Testes	% Alginato (m:m)	% ALMP (m:v)	% Gelatina (m:v)	% TG (m:v)	CaCl_2 (mol/L)
1	1,5	0	0	4	0,4
2	0,3	0,4	0	5	0,1
3	0,3	1,6	0	5	0,1
4	1,2	1,6	0	5	0,1
5	2,4	1,6	0,8	5	0,1
6	1,5	1	4	5	0,1
7	1,5	0	2	5	0,1

A Tabela 32 e a Figura 22 ilustram os valores em porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose das quatro bateladas, conversão média

das bateladas, conversão média das triplicatas dos sete ensaios do estudo univariável dos efeitos da concentração de ALMP, alginato de sódio, gelatina, CaCl_2 em soluções esterilizadas por autoclavagem, e TG na imobilização de *S. plymuthica*. Neste estudo foi obtido melhor média de conversão de sacarose em isomaltulose (72,66%) no ensaio 7, utilizando-se células de *S. plymuthica* imobilizadas com 1,5% (m:m) de alginato de sódio 14000 cP Sigma-A7128, 0% de ALMP, 2% (m:v) de gelatina, 5% (m:v) de TG e 0,1mol/L de CaCl_2 .

Observou-se que é possível utilizar a ALMP na composição da matriz de imobilização, porém o resultado final da conversão de sacarose em isomaltulose independe da presença deste sacarídeo quando as células de *S. plymuthica* são imobilizadas em alginato de sódio, gelatina e TG nas condições otimizadas.

Recentemente a aplicação de ALMP foi estudada por SANDOVAL-CASTILLA e colaboradores (2010) como matriz alternativa de microencapsulação de *Lactobacillus casei* para adição em bebida láctea como probiótico. Foram estudadas matrizes de imobilização formadas por alginato, ALMP e misturas de alginato-ALMP nas proporções de 1:2, 1:4 e 1:6. Os autores concluíram que o alginato contribuiu significativamente para a esfericidade dos grânulos e a ALMP contribuiu positivamente com a estabilidade e resistência mecânica dos grânulos. Foi observado que quanto maior a concentração de pectina maior a dureza e resistência mecânica dos grânulos e isso implicou diretamente em maior capacidade de retenção das células.

Tabela 32. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas, conversão média das quatro bateladas, conversão média das triplicatas em cada ensaio e desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas dos 7 ensaios para estudo univariável do efeito da concentração de ALMP, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas, e TG na imobilização de células de *S. plymuthica* (A, B e C são as triplicatas de cada um dos sete ensaios).

Ensaio	% de conversão de sacarose em isomaltulose				Média	Média	Desvio
	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4	Bateladas	Ensaio	Padrão
1A	80,96	79,42	75,03	33,49	67,23		
1B	82,93	79,95	69,78	24,73	64,35	64,33	2,91
1C	79,89	80,51	66,11	19,13	61,41		
2A	80,89	79,58	76,02	58,33	73,70		
2B	80,86	79,50	71,05	23,34	63,69	67,31	5,55
2C	80,78	82,07	71,22	24,14	64,55		
3A	81,31	83,73	70,60	33,58	67,31		
3B	81,40	78,96	61,81	22,46	61,16	64,24	3,07
3C	80,83	80,05	69,45	26,67	64,25		
4A	79,18	78,78	72,46	33,32	65,94		
4B	80,96	80,01	60,76	18,91	60,16	63,52	3,00
4C	81,06	79,00	69,06	28,78	64,47		
5A	81,20	78,03	66,56	20,58	61,59		
5B	79,23	79,01	65,46	17,85	60,39	62,34	2,42
5C	79,84	78,65	71,78	29,89	65,04		
6A	81,13	78,80	68,69	27,29	63,98		
6B	81,12	80,72	74,73	56,09	73,16	68,70	4,60
6C	79,75	79,06	77,45	39,52	68,94		
7A	79,96	80,82	76,04	56,71	73,38		
7B	80,39	79,07	75,88	60,37	73,93	72,66	1,74
7C	80,96	79,04	76,04	46,66	70,67		

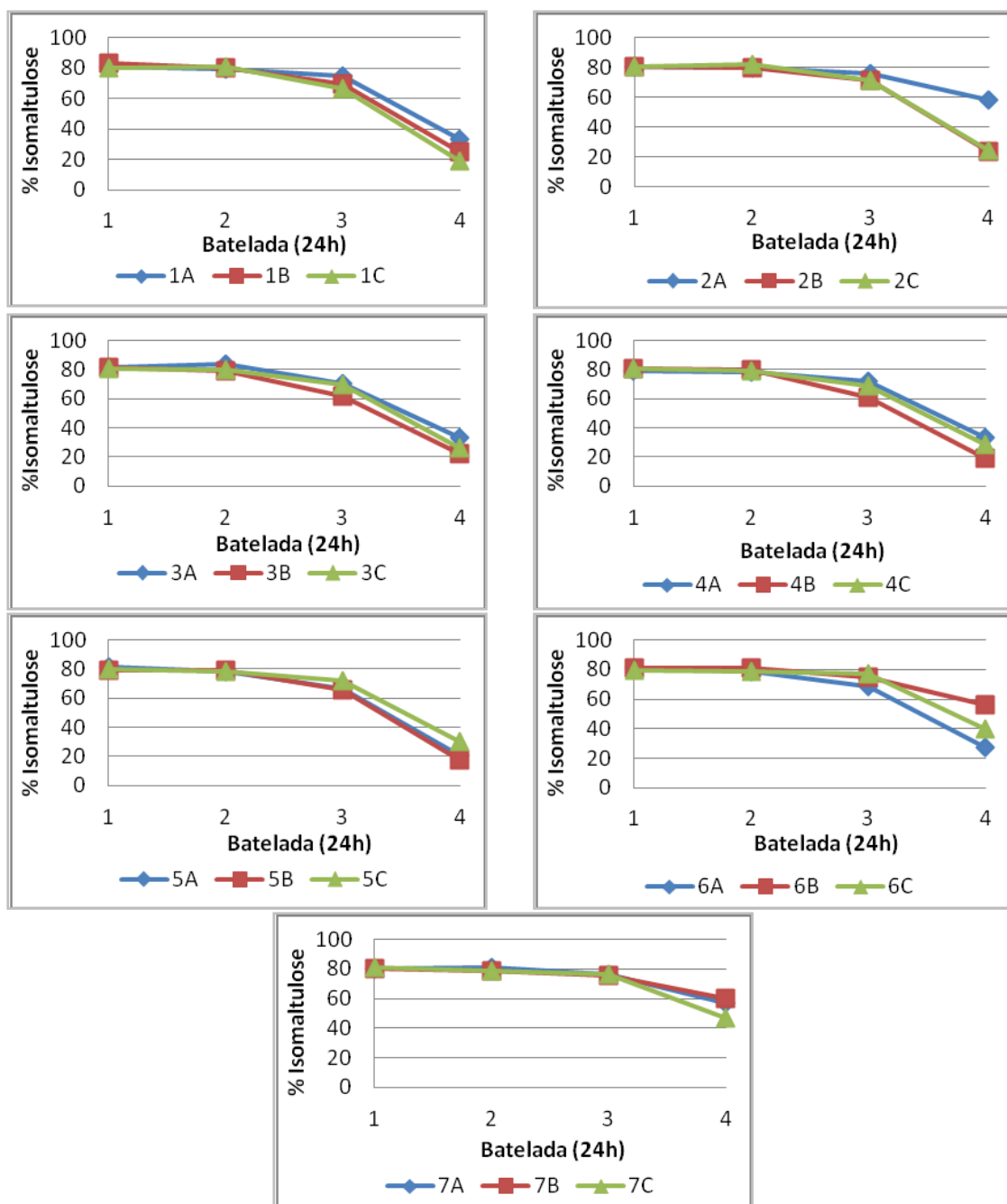


Figura 22. Conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 7 ensaios em triplicata durante quatro bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas, e TG na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.

A Tabela 33 e a Figura 23 ilustram as porcentagens de conversão de sacarose em isomaltulose por quatro bateladas, média das quatro bateladas, média das triplicatas para os sete ensaios do estudo univariável do efeito da concentração de ALMP não esterilizada, alginato de sódio, gelatina e CaCl_2 esterilizados por autoclavagem e TG. Os resultados foram muito semelhantes aos obtidos no estudo anterior no qual a ALMP utilizada no processo de imobilização celular foi esterilizada por autoclavagem, isso indica que o tratamento térmico desse polissacarídeo não interferiu na imobilização das células de *S. plymuthica* e conversão de sacarose em isomaltulose.

SANDOVAL-CASTILLA e colaboradores (2010) observaram que quanto maior a concentração de pectina maior a dureza e resistência mecânica dos grânulos e isso implicou diretamente em maior capacidade de retenção das células. Segundo os autores, esse resultado indica as diferenças existentes entre as ligações cruzadas da rede polimérica formada no alginato de cálcio, pectato de cálcio e alginato-pectato de cálcio.

CONTESINI e colaboradores (2012) estudaram a imobilização da glicosiltransferase de *Erwinia sp.* em ALMP e gordura (manteiga e ácido oléico). As microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em ALMP e gordura que foram liofilizadas apresentaram conversão de sacarose em isomaltulose superior a 60% enquanto as microcápsulas não liofilizadas apresentaram conversão de 30% de sacarose em isomaltulose na primeira batelada.

Tabela 33. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose durante quatro bateladas de 24 horas, conversão média das quatro bateladas, conversão média das triplicatas em cada ensaio e desvio padrão dos valores obtidos nas triplicatas dos 7 ensaios para estudo univariável do efeito da concentração de ALMP não autoclavada, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas e TG na imobilização de células de *S. plymuthica* (A, B e C são as triplicatas de cada um dos sete ensaios).

Ensaio	% de conversão de sacarose em isomaltulose				Média	Média	Desvio
	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4	Bateladas	Ensaio	Padrão
1A	80,62	76,80	64,23	36,08	64,43		
1B	80,11	79,35	63,88	35,88	64,80	63,78	1,46
1C	80,17	76,89	59,71	31,63	62,10		
2A	82,52	80,03	70,47	49,04	70,51		
2B	81,90	77,91	65,11	42,22	66,78	68,63	1,87
2C	81,26	79,88	68,10	45,18	68,60		
3A	81,64	74,17	56,64	34,71	61,79		
3B	81,89	78,61	65,52	38,92	66,23	66,24	4,46
3C	81,58	79,21	71,21	50,81	70,70		
4A	81,04	78,22	65,87	37,78	65,72		
4B	80,72	77,48	64,52	40,02	65,68	64,96	1,28
4C	81,69	75,62	61,54	35,09	63,48		
5A	80,93	77,04	68,08	43,20	67,31		
5B	80,98	76,58	65,49	39,47	65,63	66,89	1,11
5C	81,19	77,47	67,99	44,27	67,73		
6A	80,73	78,31	68,95	46,39	68,60		
6B	80,76	78,92	69,38	49,37	69,61	68,69	0,87
6C	82,24	77,76	60,76	50,73	67,87		
7A	77,39	70,32	62,68	51,92	65,58		
7B	82,30	78,48	70,95	35,63	66,84	66,21	0,89
7C	80,62	76,80	64,23	36,08	64,43		

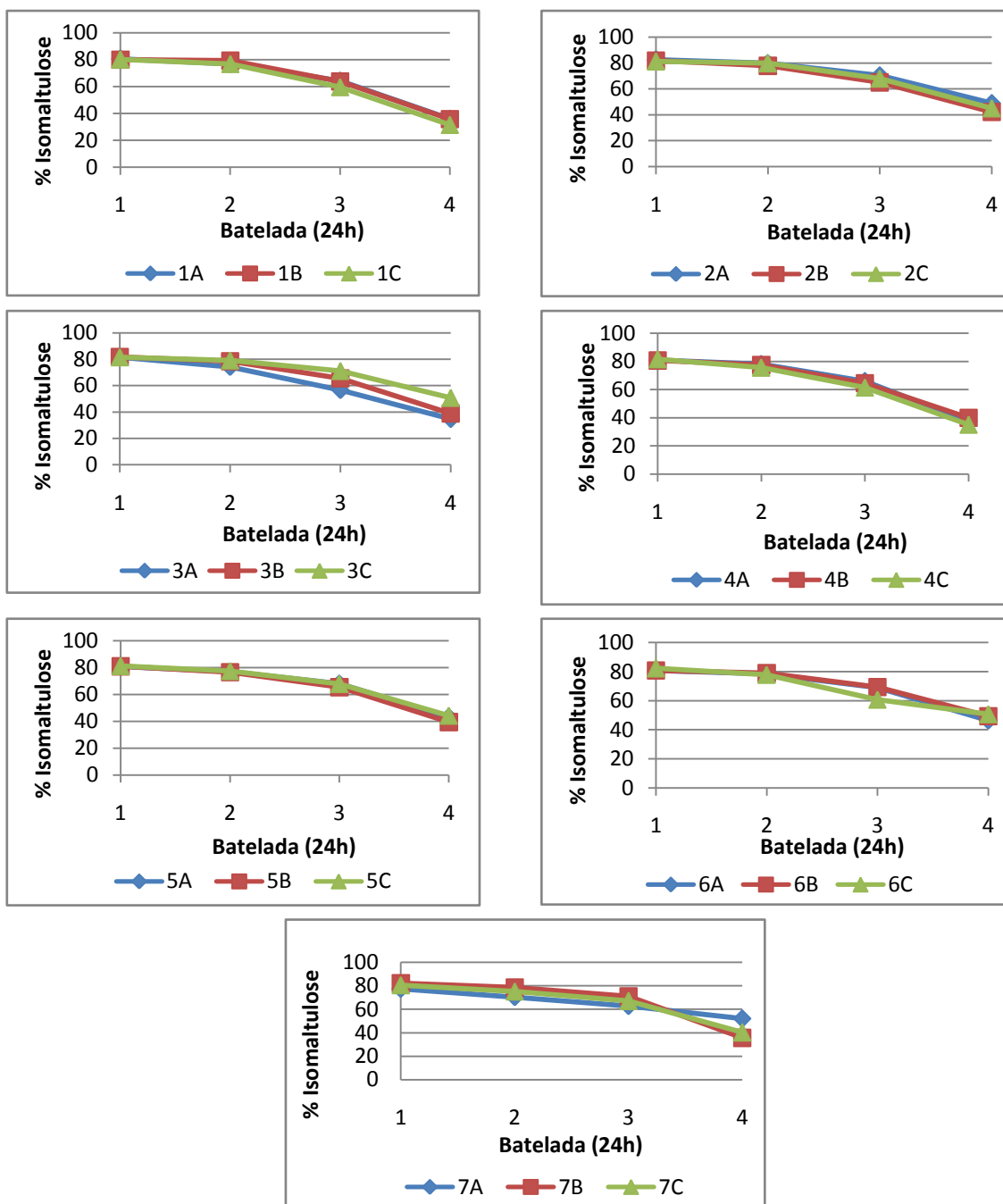


Figura 23. Porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose obtidos nos 7 ensaios em triplicata, durante quatro bateladas de 24 horas para estudo dos efeitos da concentração de ALMP não autoclavada, alginato, gelatina, CaCl_2 em soluções autoclavadas e TG na imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928.

4.2.4 Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose por células imobilizadas de *S. plymuthica* em alginato com gelatina e TG em processo contínuo, utilizando coluna de leite empacotado

Os materiais e procedimentos empregados para a obtenção dos resultados abaixo estão descritos no item 3.3.4.

Foram realizados seis testes de conversão de sacarose utilizando-se grânulos de células de *S. plymuthica* (34% de massa celular úmida) imobilizadas em matriz contendo 1,7% de alginato de sódio 14000cP Sigma[®]-A7128, 0,5% de gelatina Vetec[®] e 3,5% de transglutaminase, em colunas de leite empacotado em processo contínuo, variando-se a temperatura (25 e 27°C) e o fluxo de substrato solução de 35% de sacarose (açúcar cristal) (0,2; 0,3; 0,5 e 0,65mL/min) como descrito no item 3.3.4. A cada 12 horas de conversão foram retiradas amostras para análise de carboidratos por HPLC como descrito no item 3.2.1.1. A Figura 25 mostra os resultados de conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose na Coluna 1, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,3mL/min a 25°C. Nas primeiras 10 horas de processo foram obtidos 68,9% de conversão sacarose em isomaltulose e 6,7% de trealulose, sendo que a partir de 17 horas de processo observou-se um aumento para 75,7% de conversão de sacarose em isomaltulose. Esse aumento provavelmente deve-se ao fato de que após algumas horas de circulação de substrato, aumentou o contato efetivo do substrato com o micro-organismo imobilizado. A taxa de conversão diminuiu

lentamente, sendo que por volta de 144 horas foi obtido 57,8% de isomaltulose. A taxa de conversão de sacarose em trealulose foi mantida constante apresentando média de 7,3% após 200 horas de processo. A Figura 24 ilustra as células de *S. plymuthica* imobilizadas em matriz de alginato, gelatina e TG, empacotadas em coluna encamisada.



Figura 24. Grânulos de células de *S. plymuthica* imobilizadas dispostas em coluna de leite empacotado.

Durante o processo de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose e trealulose foram formados glicose e frutose em concentrações inferiores a 8% que estão representados também nas Figuras 25-30.

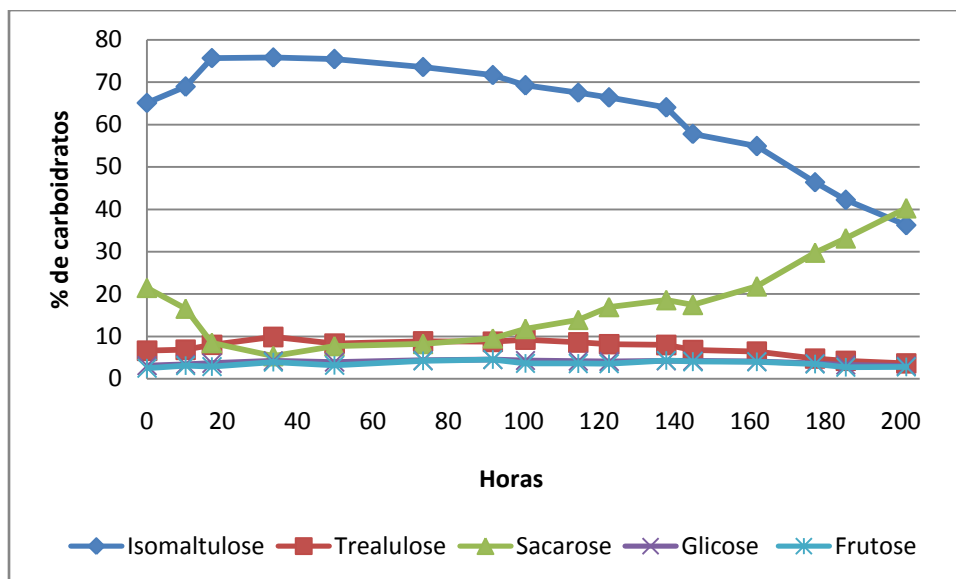


Figura 25. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C e fluxo de substrato de 0,3mL/min (Coluna 1).

A Figura 26 mostra os resultados de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG, obtidos na Coluna 2, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,2mL/min a 25°C. Nas primeiras 10 horas de processo foram obtidos 61,0% de conversão da sacarose em isomaltulose e 5,8% de trealulose, sendo que a partir das 30 horas observou-se um aumento para 75,5% de conversão de sacarose em isomaltulose. Essa taxa de conversão foi mantida com ligeiro declínio sendo obtido 50,6% de isomaltulose após 200 horas de uso contínuo das células imobilizadas. Dentre as condições estudadas esta foi a que apresentou maior estabilidade de conversão

de sacarose em isomaltulose, como também as mais altas taxas de conversão. A taxa de conversão de sacarose em trealulose foi mantida constante apresentando média de 7,4% após 200 horas de processo.

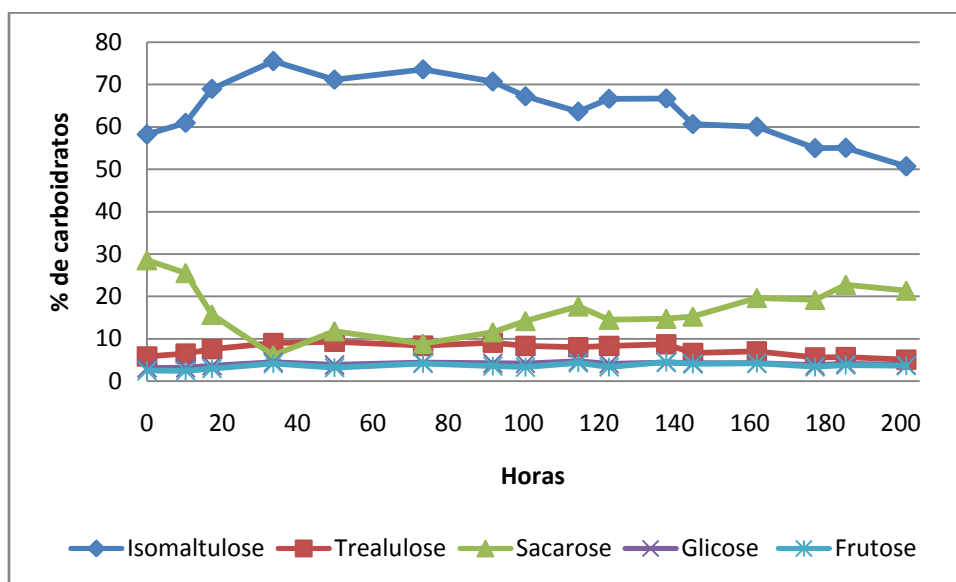


Figura 26. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,2mL/min (Coluna 2).

A Figura 27 mostra os resultados de conversão de solução 35% de sacarose obtidos na Coluna 3, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,5mL/min a 25°C. Nas primeiras 24 horas de processo foram obtidos 61,6% de isomaltulose e 5,7% de trealulose. Essa taxa de conversão foi mantida constante até cerca de 80 horas, a partir deste observou-se declínio da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que, após 170 horas de uso contínuo das células imobilizadas foi obtido 42,7%. O fluxo de substrato empregado neste teste

provavelmente foi muito alto, dificultando a reação da enzima com o substrato ou aumentando a lixiviação das células da matriz de alginato de cálcio com gelatina e TG.

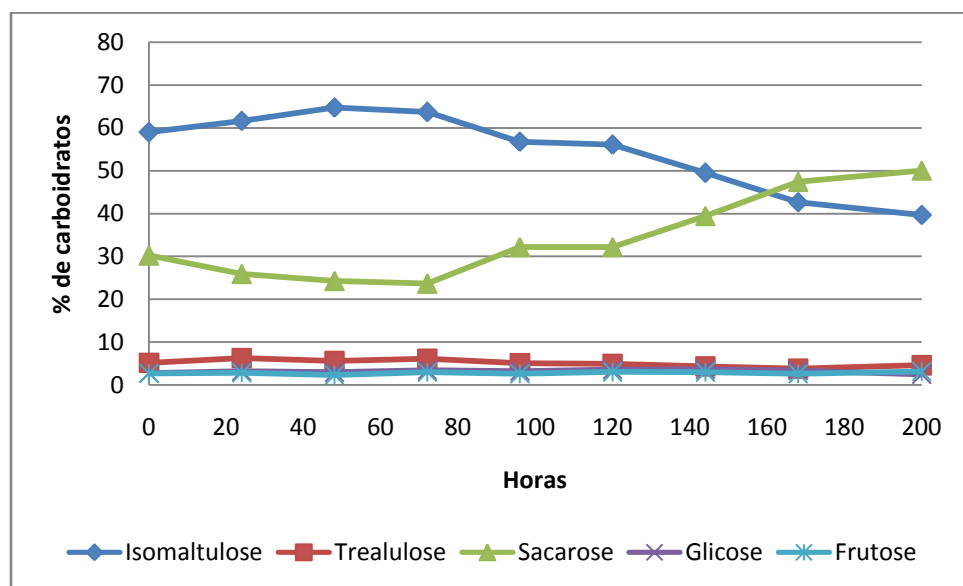


Figura 27. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,5mL/min (Coluna 3).

A Figura 28 mostra os resultados de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose obtidos na Coluna 4, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,65mL/min a 25°C. Nas primeiras 24 horas de processo foram obtidos 51,0% de conversão de sacarose em isomaltulose e 4,3% de trealulose. Essa taxa de conversão foi mantida constante até 120 horas de uso contínuo das células imobilizadas, a partir daí observou-se

declínio da taxa de conversão de sacarose sendo obtido 25% de isomaltulose após 200h de processo.

Observou-se que o aumento do fluxo de substrato de 0,5mL/min (Figura 26) para 0,65mL/min (Figura 28) resultou em diminuição de conversão de sacarose em isomaltulose.

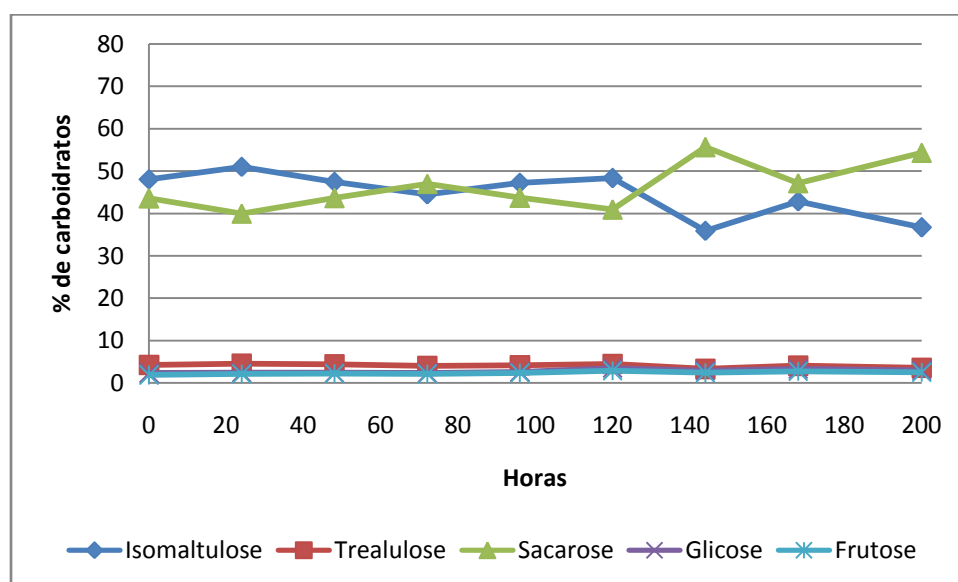


Figura 28. Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 25°C com fluxo de substrato de 0,65mL/min (Coluna 4).

A Figura 29 mostra os resultados de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose obtidos na Coluna 5, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,3mL/min a 27°C. Nas primeiras 72 horas de utilização contínua da coluna de células imobilizadas de *S.plymuthica*

foram obtidos uma média de 48,95% de conversão sacarose em isomaltulose e 2,4% de trealulose, sendo que, a partir deste período observou-se acentuado declínio da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose. Dentre as condições estudadas esta foi a que apresentou menor estabilidade de conversão de sacarose em isomaltulose, como também as menores taxas de conversão. O aumento de dois graus na temperatura de reação apresentou alta influência na conversão de sacarose em isomaltulose, comparado com o ensaio realizado a 25°C e utilizando o mesmo fluxo de substrato (0,3mL/min) (Figura 25).

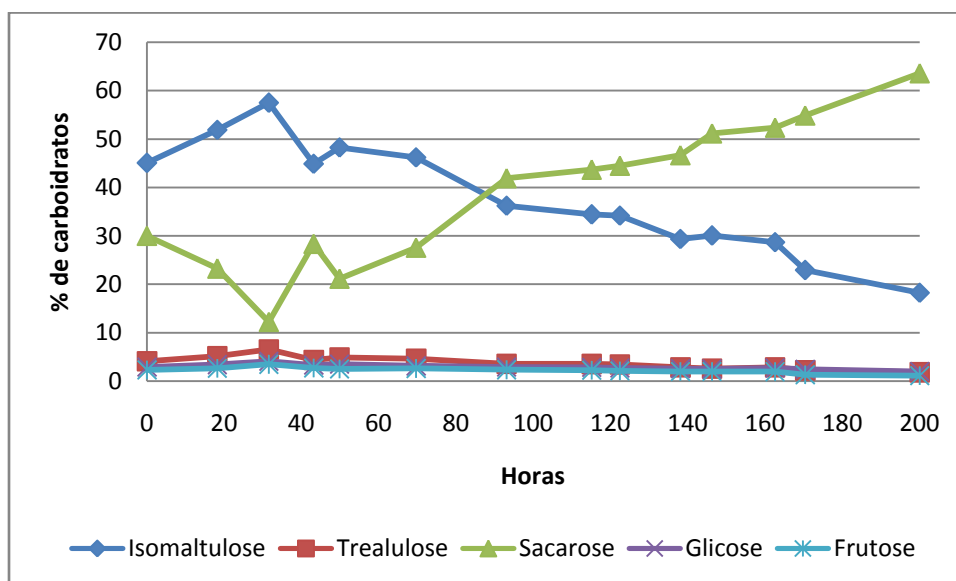


Figura 29. Conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 27°C com fluxo de substrato de 0,3mL/min (Coluna 5).

A Figura 30 mostra os resultados de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose obtidos na Coluna 6, mantida por 200 horas com fluxo de substrato 0,2mL/min a 27°C. Nas primeiras 18 horas de processo foram obtidos 60,3% de conversão da sacarose em isomaltulose e 5,9% de trealulose. Essa taxa de conversão foi mantida com ligeiro declínio até cerca de 100 horas com 54,8% de isomaltulose seguido por acentuado declínio da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose, sendo que, após 200 horas de uso contínuo das células imobilizadas foi obtido 30% de isomaltulose.

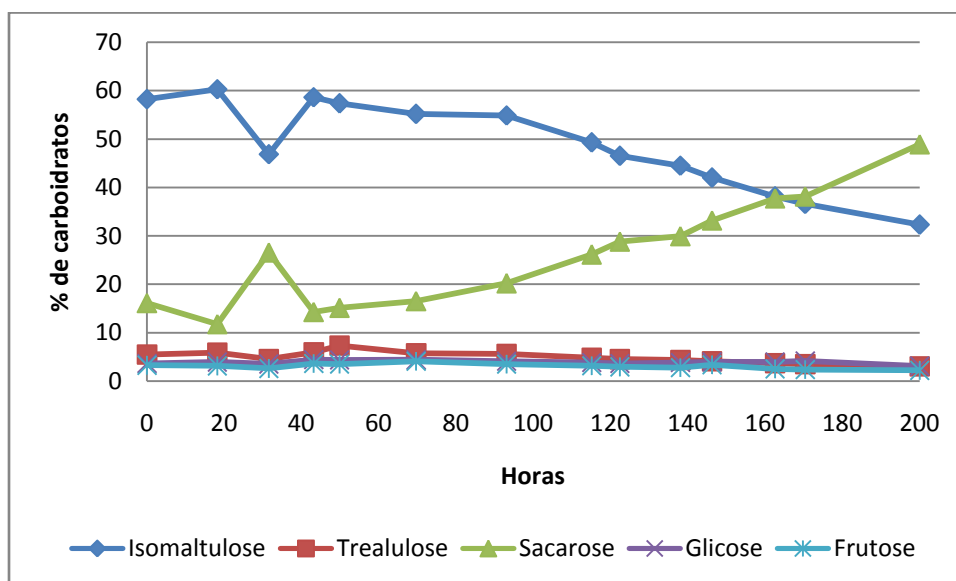


Figura 30. Conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *Serratia plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em processo contínuo a 27°C com fluxo de substrato de 0,2mL/min (Coluna 6).

A Tabela 34 apresenta os valores médios de isomaltulose, trealulose, glicose e frutose obtidos a partir de solução 35% de sacarose nas seis colunas de

células imobilizadas em matriz de 1,7% de alginato de cálcio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG testadas a 25 e 27°C utilizando-se diferentes fluxos de substrato ao longo de 200 horas. Observou-se que o aumento da temperatura de 25 para 27°C causou efeito negativo nas taxas de conversão, visto que as Colunas 3 e 4, cujo processo foi mantido a 27°C apresentaram resultados cerca de 40% inferiores aos resultados obtidos nas Colunas 1 e 2 para a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se os mesmos fluxos de substrato. Observou-se que o aumento do fluxo de sacarose também apresentou efeito negativo sobre as taxas de conversão, resultando em redução de estabilidade da conversão de sacarose em isomaltulose ao longo do tempo.

No processo contínuo um menor fluxo de substrato, reflete em maiores taxas de conversão, provavelmente devido ao maior tempo de contato entre substrato e enzima, um fluxo mais elevado poderia carregar as células causando desprendimento da matriz de imobilização, com isso reduzindo a estabilidade do processo. Pode-se considerar também, que em um fluxo elevado ocorre a passagem de substrato pelas vias mais livres, enquanto em fluxo mais lento, torna possível a entrada do substrato nos poros da matriz de imobilização, aumentando as possibilidades de contato e conversão da sacarose em isomaltulose.

Tabela 34. Médias das taxas de conversão de sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose pelas células imobilizadas de *S. plymuthica* em matriz de 1,7% de alginato de sódio, 0,5% de gelatina e 3,5% de TG em colunas de leito empacotado, em processo contínuo por 200 horas.

Açúcares	Fluxo e temperatura do substrato sacarose 35%					
	0,3mL/min a 25°C	0,2mL/min a 25°C	0,5mL/min a 25°C	0,65mL/min a 25°C	0,3mL/min a 27°C	0,2mL/min a 27°C
	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5	Coluna 6
% média de conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose						
Isomaltulose	63,2	64,0	53,6	42,7	34,8	46,1
Trealulose	7,3	7,4	5,0	3,9	3,4	4,6
Sacarose	17,5	16,7	35,4	48,6	41,7	29,1
Glicose	3,9	4,0	3,1	2,7	2,8	3,8
Frutose	3,5	3,6	2,8	2,3	2,1	3,0

KAWAGUTI E SATO (2010a) estudaram o efeito da concentração de substrato sacarose (açúcar cristal) (35 a 55% m/v) e do fluxo (0,5 a 1,0mL/min) na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo contínuo, utilizando-se coluna empacotada de células de *Erwinia* sp. imobilizadas em alginato de cálcio. Os melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose (63,2%) foram obtidos utilizando 35% de sacarose e fluxo de 0,6mL/min.

AHN *et al.* (2003) utilizaram células imobilizadas da linhagem *Erwinia rhapontici* ATCC 29283 para converter sacarose em isomaltulose. A suspensão celular 40% (m/v) foi misturada com igual volume de solução 5% de alginato de sódio e gotejadas em solução de CaCl₂ 0,15 M para formar os grânulos contendo células imobilizadas; e posteriormente foram dispostas em colunas encamisadas (50 x 180 mm) a 30°C, com circulação de solução de sacarose 55%. Foram

testadas temperaturas à 27°C, 30°C e 33°C e os rendimentos iniciais de isomaltulose foram respectivamente, 79%, 89% e 85% e diminuíram para 67%, 79% e 57% após 60 dias, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

As células livres de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, produtora de glicosiltransferase, converteram a sacarose (solução 35% (m:v)) em 79% de isomaltulose, 8,2% de trealulose, 4,8% de frutose, e 4,9% de glicose, sendo que 2,9% da sacarose não foi hidrolisada.

A conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *S. plymuthica* ATCC 15928, em processo em batelada, foi favorecida utilizando-se solução de sacarose 30% e temperaturas de 25 - 30°C, obtendo-se altos valores de conversão em isomaltulose (79 - 78,9% respectivamente), após 75 minutos de reação.

As células de *S. plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em alginato de sódio B de alta viscosidade (14.000 cP Sigma-A7128) e C (20.000 cP Sigma-180947) apresentaram os melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose, comparados com as células imobilizadas em alginato de sódio A (250 cP Sigma A-2158), D (Fluka 71240) e E (Synth A1089.01AF). A utilização do alginato de sódio B, selecionado para a imobilização, apresentou vantagens como maior facilidade de dissolução, melhor fluidez na tubulação da bomba peristáltica e obtenção de partículas mais homogêneas em relação ao alginato de sódio C.

A adição da enzima TG na suspensão celular de *S. plymuthica* ATCC 15928 e alginato de sódio na etapa de imobilização celular resultou em melhora na estabilidade da conversão de sacarose em isomaltulose, comparada com as células imobilizadas somente com alginato de cálcio.

Utilizando-se células de *S. plymuthica* ATCC 15928 imobilizadas em condições otimizadas (1,7% de alginato de sódio (Sigma[®] A-7128)), 0,25 mol/L de CaCl₂ (Sinth[®] P.A.), 0,5% de gelatina (Vetec[®] P.A), 3,5% de transglutaminase (ACTIVA TG-BP[®] - Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda.), concentração de massa celular úmida de *S. plymuthica* 33,5% (m:v), solução 35% de sacarose (m:v), e temperatura de 30°C foi obtido taxa de conversão média de 71,04% de sacarose para isomaltulose por 4 bateladas, sendo que na primeira batelada a taxa de conversão foi de 75,82% apresentando ligeiro declínio nas bateladas seguintes.

Utilizando-se 7g de células imobilizadas de *S. plymuthica* ATCC 15928 em alginato de cálcio-gelatina-TG e solução 35% de sacarose, foram obtidos 140mL de xarope com taxa média de 71,04% em isomaltulose e 6,2% em trealulose após 4 bateladas de 24h.

No processo contínuo de conversão de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas de *S. plymuthica* em alginato de cálcio com TG e gelatina foram obtidas altas taxas de conversão e boa estabilidade, por 200 horas, sendo obtido, na melhor condição (25°C e fluxo de substrato 0,2mL/min) concentração média de 64,0% de isomaltulose e 7,4% de trealulose e outros açúcares.

Utilizando-se as células de *S. plymuthica* imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TG em processo contínuo, o aumento da temperatura de 25 para 27°C e o aumento do fluxo de 0,2 para 0,655mL/min apresentou efeito negativo, reduzindo as taxas de conversão de sacarose em isomaltulose e a estabilidade das células imobilizadas.

A adição de pectina de baixo teor de metoxilação (ALMP) na suspensão celular contendo alginato de sódio, gelatina e TG, para a imobilização de *S. plymuthica* ATCC 15928 não resultou em aumento significativo da estabilidade das células imobilizadas e da conversão de sacarose em isomaltulose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHET, D; HE, X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. **Polymer**, Oxford, v.36, n.4, p. 787-791, 1995.

AHN, S.J.; YOO, J.H.; LEE, H.C.; KIM, S.Y.; NOH, B.S.; KIM, J.H.; LEE, J.K. Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici*. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1179-1183, 2003.

ARAI H.; MIZUNO A.; SAKUMA M.; FUKAYA M.; MATSUO K.; MUTO K.; SASAKI H.; MATSUURA M.; OKUMURA H.; YAMAMOTO H.; TAKETANI Y.; DOI T.; TAKEDA E. Effects of a palatinose-based liquid diet (Inslow) on glycemic control and the second-meal effect in healthy men. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.56, p.115-121, 2007.

AMSDEN, B.; TURNER, N. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, n.5, p. 605-610, 1999.

BENTON, D; JARVIS, M. The role of breakfast and a mid-morning snack on the ability of children to concentrate at school. **Physiology and Behavior**, v.90, n. 2-3, p. 382-385, 2007

CHEETHAM, P.S.J.; IMBER C. E.; ISHERWOOD J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v. 299, p. 628–631, 1982

CHEETHAM, P.S.J. The extration and mechanism of a novel isomaltulose synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemical Journal**, v. 220, n. 1, p. 213-220, 1984.

CONTESINI, J.F.; IBARGUREN, C. GROSSO, C.R.F.; CARVALHO, P.O.; SATO, H.H. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. **Journal of Biotechnology**, v. 158, p. 137-143, 2012

CREAMER, L.K. Casein nomenclature, structure and association properties. In: ROGINSKI, H.; FULQUAY, J.W.; FOX, P.F. (Ed.) **Enciclopedia of Dairy Sciences: Milk Proteins**. New York: Academic Press, v. 3, p. 1895-1902, 2002.

DERVAKOS, GA; WEBB, C; On the merits of viable-cell immobilization, **Biotechnol. Adv.** v. 9, n. 4, p. 559-612, 1991.

DUFLOT, P.; FOUACHE, C. Method for producing palatinitol. **US Patent**, 6.204.378, 2001.

FUCHSBAUER, H.L.; GERBER, U.; ENGELMANN, J.; SEEGER, T.; SINKS, C.; HECHT, T. Influence of gelatin matrices crosslinked with transglutaminase on the properties of an enclosed bioactive material using β -galactosidase as model system. **Biomaterials**, v. 17, n. 15, p. 1481-1488, 1996.

FUNDUEANU, G; NASTRUZZI, C, CARPOV, A; DESBRIERES, J; RINAUDO, M. Physico-chemical-characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, p. 1427-1435, 1999.

GOULTER, KC; HASHIMI, SM; BIRCH, RG. Microbial sucrose isomerases: producing organisms, genes and enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 57-64, 2012.

GUZEY, D., McCLEMENTS, D.J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Adv. Colloid Interface Sci.** v.128, p. 227–248, 2006.

HASHIMOTO, H., YAMADA, K., YOSHIMURA, J. Glucosilation of methyl- β -D-arabinofuranosidase with 6' chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 12, p. 849-854, 1987.

HOLUB, I.; GOSTNER, A.; THEIS, S.; NOSEK, L.; KUDLICH, T.; MELCHER, R.; SCHEPPACH, W. Novel findings on the metabolic effects of the low glycemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose®). **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 12, p.1730-1737, 2010.

HUANG, J.H.; HSU, L.H.; SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1998.

JOSEPH, I.; VENKATRAN, S. Iodometacin sustained release from alginate gelatin or pectin gelatin coacervates. **International Journal of Pharmaceutics**, v.126, p.161-168, 1995.

KAMATA, Y.; ISHIKAWA, E.; MOTOKI, M. Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.56, p.1323-1324, 1992

KAKINUMA, H.; YUASA, H.; HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of α -glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydrate Research**,

v. 312, n. 3, p. 103-115, 1998.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.E.; ITOKAWA, Y. J. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats.

Journal of Nutritional Science and Vitaminology, v. 42, n. 1, p. 69-76, 1996.

KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M.F.; SATO, H.H. Isomaltulose production using free cells: optimization of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.34, p. 274-285, 2006.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Effect of concentration and substrate flow rate on isomaltulose production from sucrose by *Erwinia sp.* cells immobilized in calcium-alginate using packed bed reactor. **Appl. Biochem Biotechnol.** v.162, p. 89-102, 2010a.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Isomaltulose production by free cells of *Serratia plymuthica* in a batch process. **Food chemistry**, v.120, n.3, p.789-793, 2010b.

KAWAGUTI, H.Y.; CELESTINO, E.M.; MORAES, A.L.L.; YIM, D.K.; YAMAMOTO, L.K.; SATO, H.H. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.211-217, 2010c.

KAWASHITA, H.; SUGITA, K.; SAITO, K.; TAMADA, M.; SUGO, T.; KAWAMOTO, H. Production of cycloisomaltooligosaccharides from dextran using enzymes immobilized in multilayers on to porous membranes. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 465-469, 2002.

KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D. STANCHEV, V. Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor. **Process Biochem.** v. 42, p. 1655-1659, 2007.

KRASTANOV, A.; BLAZHEVA, D.; YANAKIEVA, I.; KRATCHANOVA, M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. **Enzyme Microb. Technol.** v. 39, p. 1306-1312, 2006.

KRASTANOV, A.; YOSHIDA, A. J. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v.30, n.593, 2003.

LICHTENTHALER, F. W. The keys sugar of biomass: availability, present non-food uses and potential future development lines. Editores KAMM, B.; GRUBER, P.R;

KAMM, M. **Biorefineries- Industrial Processes and Products, Status Quo and Future Directions**, v. 2, p.3-59, 2006.

LINA, B.A.; JONKER, D.; KOSIANOWSKI, G. Isomaltulose (Palatinose): a review of biological and toxicological studies. **Food Chemistry Toxicology**. v. 40, n. 10, p. 1375-1381, 2002

LOO, J.V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T.V. e HEUVEL, E.V.D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 121-132, 1999.

LUND, B. M.; WYATT, G. M. The nature or reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 331-336, 1973.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.4, p.413-419, 2005.

MAKI,Y.; OHTA, K.; TAKAZOE, Y.; MATSUKUBO,Y.; TAKAESU,Y.; TOPITSOGLOU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspensions of human dental plaque. **Caries Research**, v.17, p.335-339, 1983.

MARUDOVA, M.; JILOV, N. Influence of sodium citrate and potassium-sodium tartrate on gelation of low-methoxyl amidated pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 177-180, 2003.

MATIA-MERINO, L.; LAU, K.; DICKINSON, E. Effects of low metoxyl amidated pectin and ionic calcium rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. **Food Hidrocolloids**, v. 18, p. 271-281, 2004.

McALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. e FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v.12, n.9, p.667-672, 1990.

MOYNIHAN, P.J. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. **Journal of Dentistry**, v. 26, n. 3, p. 209-218, 1998.

MUNDRA, P; DESAI, K; LELE, S. S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose. **Bioresource Technology**, v.98, p.2892-2896, 2007.

NAGAI-MIYATA, J.; TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 2049-2053, 1993.

NAGAY, Y.; SUGITANI, T.; KOZO, Y. TADASHI, E.; SHIRO, K. Practical approach to trehalulose production using a reactor of immobilized cells. **J.Japan, Soc. Food Sci. Technol.** v. 50, p. 488-492, 2003.

OLIVA-NETO, P; MENÃO, P.T.P. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v.100, p.4252-4256, 2009.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N. e HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v.39, n.1, p.43-49, 1983

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.;FUJUWARA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with *Streptococci mutans*. **Caries Research**, v. 25, p. 277-282, 1991

ORSI, D.C.; Produção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando a bactéria *Serratia plymuthica*. Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 148p. 2008.

PARK, Y.K.; UEKANE. R.T.; PUPIN, A.M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 7, 547-551, 1992.

PARK, Y.K.; UEKANE, R.T.; SATO, H.H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 131-136, 1996.

PARTANEN, R.; AUTIO, K.; MYLLARINEN, P.; LILLE, M.; BUCHERT, J.; FORSSELL, P. Effect of transglutaminase on structure and syneresis of neutral and acidic sodium caseinate gels. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 414-421, 2008

PARTANEN, R.; PAANANEN, A.; FORSSELL, P.; LINDER, M.B.; LILLE, M.; BUCHERT, J.; LANTTO, R. Effect of transglutaminase-induced cross-linking of sodium caseinate on the properties of equilibrated interfaces and foams, **Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.334, p. 79-85, 2009.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PATIL, S.; SANDBERG, A.; HECKERT, E.; SELF, W.; SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600-4607, 2007.

POPPE, J. Gelatin. In: IMESON, A. (Ed.) **Thickening and gelling agents for food**. 2^a Ed. London: Blakie Academic and professional, Cap. 7, p.144-179, 1997.

RAVAUD, S.; WATZLAWICK, H.; MATTES, R.; HASER, R.; AGHAJARI, N. Towards the three-dimensional structure of a sucrose isomerase

from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Biologia Bratislava**, v. 60, n. 16, p. 89-95, 2005.

RAVAUD, S.; ROBERT, X.; WATZLAWICK, H.; HASER, R.; MATTES, R.; AGHAJARI, N. Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1964-1968, 2009.

REN, B; LI, S; XU, H; FENG, X, CAI, H; YE, Q. Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rapontici* NX-5. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 34, p. 629-637, 2011.

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168-8173, 2005.

SALVUCCI, M. E. Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis in whiteflies, *Bemisia argentifolij*, and *Erwinia rhapontici*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, n.135, p.385-395, 2003.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; ALVAREZ-RAMÍRES, J.; VERNON-CARTER, E. J.; Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v. 43, p. 111-117, 2010.

SARKKI, M.L.; HEIKKILA, H.; VILJAVA, T. **US Patent**, 5.939.294, 1999

SCHACHT, E.; VANDICKEL, J. C.; LEMAHEN, A. ; DE ROOZE N.; VANSTEENKISTE, S. The use of gelatin and alginate for the immobilization of bioactive agents. **Spec. Publ. R. Soc. Chem**, v.138, p.18-34, 1993.

SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. **GB Patent** 2.082.591, 1982.

SHINDE, U. A.; NAGARSENKER, M. S. Characterization of gelatin-sodium alginate complex coacervation system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 3, p.313-317, 2009.

SOARES, LHB; ASSMANN, F; AYUB, MAZ. Purification and properties of transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.37, p. 295-299, 2003.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biology and Chemistry**, V.160, p.61-68, 1945.

STORKER, T. M.; SKJA, K.; BRYK, G.; SMIDSRD, O.; Covalently crosslinked sodium alginate beads. **Food Hydrocolloids**, v.5, p.119-123, 1991.

SUNGUR, S.; ELCIN, M.; AKBULUT, U. Studies on immobilization of urease in gelatin by crosslinking. **Biomaterials**, v.13, p. 795-800, 1992.

SYNOWIECKI, J.; WOLOSOWSKA,S. Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase.

Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.1417-1422, 2006.

TAIB, MSM; SHARIFF, ZM; WESNES, KA; SAAD, HÁ; SARIMAN, S. The effect of high lactose-isomaltulose on cognitive performance of young children. A double blind cross-over design study. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 81-87, 2012.

TAHERIAN, A.R., BRITTEN, M., SABIK, H., FUSTIER, P. Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.868–878, 2011.

TAKAZOE, I. In: Grenby, T.H. **Progress in Sweeteners**; ed.; Elsevier Applied Science: New York, cap. 6. 1989.

TOMINAGA ,J., KAMIYA,N. , DOI,S., ICHINOSI,H., GOTO, M. An enzymatic strategy for site-specific immobilization of functional protein using microbial transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p. 613-618, 2006.

TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trealulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.

VELINGS, N. M.; MESTDAGH, M. M.; Protein adsorption in calcium alginate gel beads. **J. Bioactive Biocompatible Polym.** v.9, p.133-141, 1994.

VERONESE, T; PERLOT, P. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. **FEBS Letters**, v. 441, n. 3, p. 348-352, 1998

VERONESE, T.; PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 263-269, 1999.

WANG,H.; KIM, I. H.; PARK, C.; LEE, J.H. Immobilization of α -amylase from *Bacillus lincheniforms* on developed support using microbial transglutaminase. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 4, p. 801-803, 2008.

WANG, J.; ZHAO, M.; YANG, X.; JIANG, Y.; CHUN, C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 2, p. 174-179, 2007.

WESNES, K. A.; PINCOCK, C.; RICHARDSON, D.; HELM, G. HAILS, S. Breakfast reduces declines in attention and memory over the morning in schoolchildren. **Appetite**, v. 41, n. 3, p. 353-361, 2003.

WU, L.; BIRCH, R. G. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p. 93-103, 2004.

WU, L.; BIRCH, R. G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.13, p. 1581-1590, 2005.

XI, W. W.; XU, J. H.; Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida Rugosa* lipase in packed bed reactor. **Process Biochemistry**, v.40, n.6, p.2161-2166. 2005.

YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 406-415, 2008.

7 ANEXOS

7.1 Estudo do efeito da concentração de proteínas (autoclavada ou não) e da TG na imobilização e estabilidade das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose.

7.1.1 MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1.1 Efeito da concentração de gelatina e de caseína (autoclavada ou não) na imobilização e estabilidade das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em alginato de cálcio com TG e conversão de sacarose em isomaltulose.

Para o estudo dos efeitos da concentração de caseína (0, 1 e 2%) e de gelatina (0, 1 e 2%) (autoclavadas ou não) na imobilização das células de *S. plymuthica* foram fixadas as concentrações de alginato de sódio (2%), massa celular 30%, cloreto de cálcio (2%) e transglutaminase (0,5%).

Foram realizados 10 ensaios em duplicata como mostra a Tabela 35. As fontes protéicas gelatina e caseína foram testadas nas concentrações 0, 1 e 2%, sendo que nos ensaios de nº2 ao nº5 as soluções de caseína e gelatina foram autoclavadas durante 15 minutos a 121°C, enquanto que nos ensaios nº7 ao nº10 as soluções de proteínas não foram autoclavadas. As soluções de alginato de sódio, cloreto de cálcio e utensílios necessários para a pesagem e dissolução da

fonte protéica e preparação da suspensão de massa celular e imobilização foram autoclavadas por 15min a 121°C.

As amostras de 8mL de solução de alginato de sódio e caseína ou gelatina, esterilizadas (Tabela 35) foram adicionadas à béqueres contendo 4mL de suspensão 30% de massa celular úmida de *S. plymuthica* (m:v) na proporção 2:1 (v:v). As suspensões foram gotejadas em solução esterilizada de CaCl₂ 2% para formar grânulos de aproximadamente 3 mm de diâmetro, os quais foram mantidos imersos na mesma solução a 5°C por 15 horas. Após esse período os grânulos foram lavados com água destilada, previamente esterilizada para a remoção do excesso de CaCl₂. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas. As amostras de grânulos contendo células imobilizadas foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução 35% (p/v) de sacarose (açúcar cristal) e incubados em agitador rotatório a 50 rpm, a 27°C. As amostras de 50 mL de solução de açúcares foram retiradas a cada 24 horas e substituídas por novas amostras de solução de sacarose 35%. As células imobilizadas foram reutilizadas por 3 bateladas. A conversão de sacarose em açúcares redutores foi estimada pela determinação de açúcares redutores como descrito no item 7.1.1.1.1.

Tabela 35. Parâmetros utilizados no estudo dos efeitos da adição de caseína ou gelatina e da etapa de autoclavagem no processo de imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e TG.

Ensaio	Alginato de sódio (%)	Massa Celular (%)	Cloreto de cálcio (%)	TG(%)	Gelatina (%)	Caseína (%)	Autoclavagem
1	2	30	2	0,5	-	-	Sim
2	2	30	2	0,5	1	-	Sim
3	2	30	2	0,5	2	-	Sim
4	2	30	2	0,5	-	1	Sim
5	2	30	2	0,5	-	2	Sim
6	2	30	2	0,5	-	-	Não
7	2	30	2	0,5	1	-	Não
8	2	30	2	0,5	2	-	Não
9	2	30	2	0,5	-	1	Não
10	2	30	2	0,5	-	2	Não

7.1.1.1.1 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro (Beckman DU-70, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA), foi utilizado um “branco” substituindo-se 50 µL de amostra por 50 µL de água destilada na mistura de reação.

7.1.1.2 Estudo do efeito da concentração da gelatina (autoclavada ou não) e TG na imobilização e estabilidade das células de *S. plymuthica* ATCC 15928 em alginato de cálcio e conversão de sacarose em isomaltulose.

Para o estudo dos efeitos da concentração da gelatina (0,5 e 1,0%) (autoclavada ou não) da transglutaminase (0,0, 0,5 e 1,5%) na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio, foram fixados as concentrações de alginato de sódio, massa celular úmida de *S. plymuthica* e cloreto de sódio em 2%, 30% e 2% (m:v) respectivamente (Tabela 36). Foram realizados oito ensaios em duplicata sendo que nos ensaios 1 a 4 as soluções de gelatina foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos enquanto que nos ensaios de 5 a 8, as soluções de gelatina não foram autoclavadas. As células imobilizadas foram reutilizadas por 3 bateladas. A conversão de sacarose em açúcares redutores foi estimada como descrito no item 7.1.1.1.1.

Tabela 36. Parâmetros utilizados no estudo da determinação dos efeitos da concentração de gelatina (autoclavada ou não) e TG no processo de imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

Ensaio	Alginato de sódio (%)	Massa Celular (%)	Cloreto de cálcio (%)	TG (%)	Gelatina (%)	Autoclavagem da gelatina
1	2	30	2	0,5	0,5	Sim
2	2	30	2	0,5	1	Sim
3	2	30	2	1	0,5	Sim
4	2	30	2	1	1	Sim
5	2	30	2	0,5	0,5	Não
6	2	30	2	0,5	1	Não
7	2	30	2	1	0,5	Não
8	2	30	2	1	1	Não
9	2	30	2	0	0,5	Sim
10	2	30	2	0	1,0	Sim

7.1.1.3 Caracterização da gelatina e alginato de sódio quanto ao potencial zeta

O potencial zeta, ou seja, a carga elétrica disponível, das soluções (1% m:m) de gelatina e alginato de sódio foi avaliado através do instrumento de distribuição de mobilidade eletroforética de partículas Zetasizer (Malvern, Worcestershire, UK), do pH 3 até o pH 8. Foram preparadas amostras em duplicata de gelatina, gelatina autoclavada e alginato de sódio. Os resultados foram expressos como médias seguidas dos seus desvios padrões.

7.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1.2.1 Efeito da concentração de gelatina e de caseína e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio com TG.

Observou-se que a esterilização das soluções de caseína e gelatina por processo de autoclavagem a 121°C por 15 minutos não causou interferência na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio utilizando a TG como agente reticulante. Na Tabela 37 e Figura 31 observa-se resultados similares de conversão de sacarose em açúcares redutores entre os ensaios de 2 a 5 (onde as fontes protéicas caseína e gelatina sofreram esterilização por autoclavagem a 121°C por 15 min) e os ensaios de 7 a 10 (que não sofreram esterilização). O procedimento de esterilização em autoclave foi testado para garantir que as alterações sofridas pelas fontes protéicas durante o tratamento térmico não representassem significativa alteração na matriz de imobilização ou no resultado de conversão de sacarose em isomaltulose.

O processo de esterilização dos materiais e reagentes é importante para aumentar a estabilidade microbiológica do processo de conversão, que é realizado em condições assépticas por três ou mais bateladas de 24 horas.

A eficiência da imobilização das células nessas condições foi avaliada pela formação de açúcares redutores durante a conversão de sacarose em

isomaltulose. Verificou-se que a adição de 1% de gelatina na suspensão celular contendo alginato de sódio e TG (ensaio 2) resultou em melhor resultado de conversão de sacarose em isomaltulose após reutilização das células imobilizadas durante três bateladas (Figura 31).

A adição de gelatina na mistura de suspensão celular, alginato de sódio e TG provavelmente contribui para o fortalecimento do gel e maior estabilidade das células imobilizadas, visto que os ensaios 1 e 6 realizados sem a adição de fonte proteica apresentaram as menores taxas de conversão (58,62 e 58,38 mg de açúcares redutores/mL), enquanto o ensaio número 2 (com gelatina 1%) apresentou maior taxa de conversão com 111,98 mg de açúcares redutores/mL.

Interações entre proteínas e polissacarídeos desempenham um papel importante na estrutura e estabilidade de alimentos. O controle e a manipulação dessas interações macromoleculares são essenciais para o desenvolvimento de novos produtos e processos na área de alimentos (YE, 2008).

Tabela 37. Média dos resultados dos açúcares redutores da primeira à terceira batelada dos ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose para estudo do efeito da concentração de caseína ou gelatina e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio com TG.

Açúcares		Açúcares	
Ensaio	redutores (mg/mL)	Ensaio	redutores (mg/mL)
1	58,62	6	58,38
2	111,98	7	93,53
3	95,17	8	105,43
4	78,69	9	107,73
5	91,05	10	101,63

Ensaios de 1 a 5 utilização de soluções de proteínas esterilizadas por autoclavagem.

Ensaios de 6 a 10 utilização de soluções de proteínas não esterilizadas.

A Figura 31 ilustra os açúcares redutores formados na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se grânulos de células de *S. plymuthica* imobilizadas com alginato de cálcio, preparados com soluções de gelatina ou caseína esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 min (ensaios 1 a 5) e não esterilizadas (ensaios 6 a 10) e TG, durante três bateladas. No ensaio número 2, foi obtido altas taxas de formação de açúcares redutores e também tendência de estabilidade do processo. Nos ensaios 1 e 6 em que não foram adicionadas gelatina ou caseína, respectivamente no processo de imobilização, os grânulos de células imobilizadas somente em alginato de cálcio e TG apresentaram rápido declínio de conversão de sacarose em açúcares redutores.

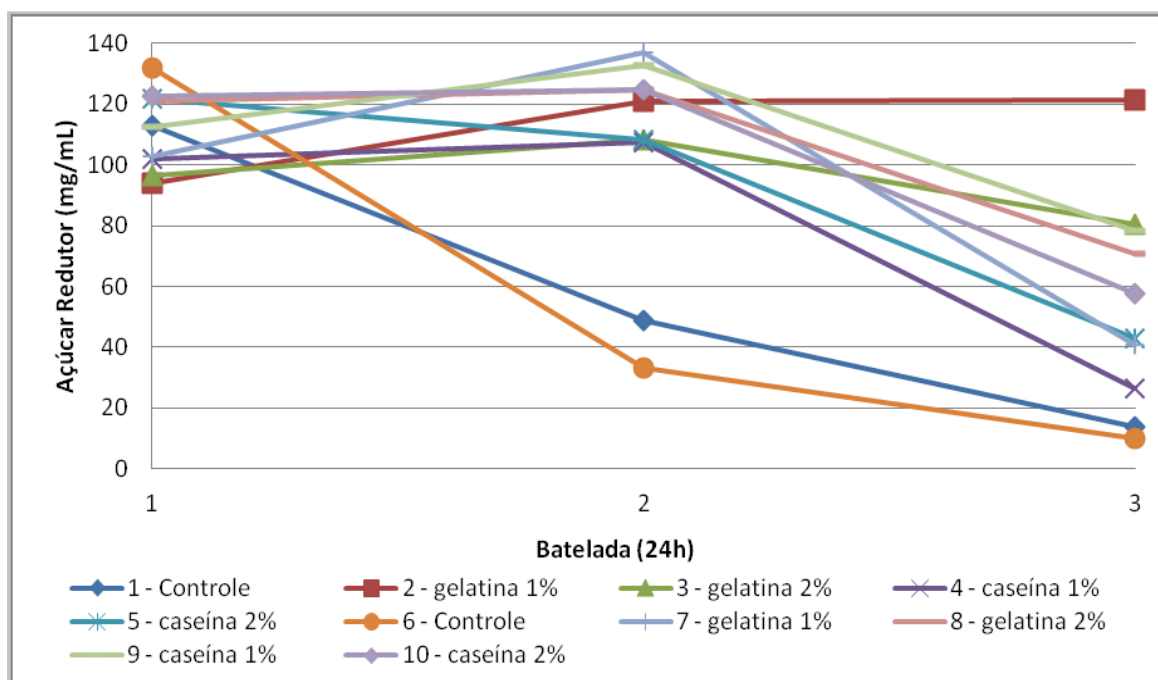


Figura 31. Estudo do efeito da concentração de caseína e gelatina e da etapa de autoclavagem das soluções de proteínas na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e TG, na conversão de sacarose em açúcares redutores, durante três bateladas de 24 horas.

A matriz formada de alginato-gelatina para a imobilização de *S. plymuthica* apresentou maior facilidade de manuseio e representou resultados de conversão de sacarose em isomaltulose até 30% superior aos da matriz alginato-caseína.

7.1.2.2 Efeito da concentração de gelatina e TG e da etapa de autoclavagem da solução de gelatina na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

Neste estudo foi aplicado somente a gelatina como fonte proteica, tendo em vista os resultados apresentados no item 7.1.2.1 e a maior facilidade de dissolução e menor custo comparado com a caseína. A Tabela 38 ilustra a média de açúcares redutores obtidos a partir de solução 35% de sacarose. Os ensaios foram acompanhados por três bateladas para estudo dos efeitos da concentração de gelatina (autoclavada ou não) na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio e TG. Nos ensaios 3 e 7 em que foram utilizados TG 1% e gelatina 0,5% foram obtidos os maiores valores de conversão de sacarose em açúcares redutores (282,60 e 336,40mg/mL) respectivamente.

O processo de autoclavagem da gelatina aplicado nos ensaios de 1 a 5 e nos controles 9 e 10 não representou diferença significativa para o resultado de conversão de sacarose em isomaltulose e tendo em vista a maior segurança microbiológica do processo, a autoclavagem da fonte proteica foi adotada como parte do protocolo de preparo para a imobilização celular.

Tabela 38. Média dos açúcares redutores da primeira à terceira batelada de conversão de sacarose em isomaltulose para estudo do efeito da concentração de gelatina (autoclavada ou não) e TG na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio.

Açúcares redutores		Açúcares	
Ensaio	(mg/mL)	Ensaio	redutores (mg/mL)
1	281,50	5	269,47
2	240,77	6	253,73
3	282,60	7	336,40
4	260,40	8	227,13
9	216,07	10	229,73

Na Figura 32, pode-se observar que os ensaios de número 3 e 7 apresentaram maior estabilidade de conversão durante as três bateladas estudadas em relação aos outros processos. Os ensaios 3 e 7 continham a menor concentração de gelatina e a maior concentração da enzima TG (0,5 e 1% respectivamente) dentre os níveis estudados.

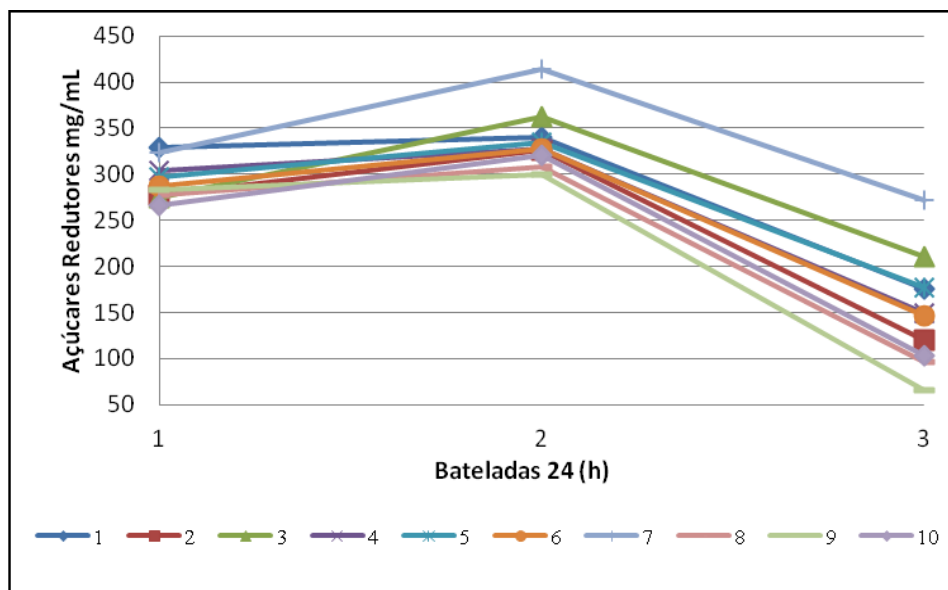


Figura 32. Estudo do efeito da concentração de gelatina (autoclavada ou não) e TG da solução de gelatina na imobilização das células de *S. plymuthica* em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em açúcares redutores durante três bateladas de 24 horas.

7.1.2.3 Caracterização da gelatina e alginato de sódio quanto ao potencial zeta

O potencial zeta permite determinar a quantidade de cargas em solução do polissacarídeo e das proteínas, podendo, assim, ser identificado se existe possibilidade de ocorrer interação eletrostática entre os materiais. Ao analisar o potencial zeta da gelatina, gelatina autoclavada e alginato de sódio, segundo o item 7.1.1.3. observou-se que as duas primeiras apresentam potencial negativo no pH das matrizes de imobilização estudadas (pH 5-6) sendo que o alginato de sódio apresentou maior carga negativa em relação à gelatina. O ponto isoelétrico

(pI) encontrado experimentalmente para a gelatina autoclavada (4,42) e para não autoclavada (4,62) indicando que em valores pH superiores a estes a gelatina apresenta carga negativa (Gelatina tipo B). Observou-se que não houve diferença significativa de carga independente do tratamento térmico de esterilização. Apesar de a proteína e o polissacarídeo apresentarem cargas negativas no pH de trabalho, pode-se observar que a intensidade de carga é bastante diferente.

Para proteínas e polissacarídeos que exibem cargas opostas pode ocorrer interações eletrostáticas, coacervação complexa ou separação de fases associativa, dando origem a complexos de proteína/polissacarídeo. Neste caso as misturas exibem duas fases distintas, uma proteína/polissacarídeo e a outra do solvente (YE, 2008).