



UNICAMP

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

Estudo da Síntese de Frutoligossacarídeos por Levanasacarase Imobilizada em Reator de Coluna

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Adriana Weber** aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de fevereiro de 2003.

Adriana Weber
Engenheira de Alimentos

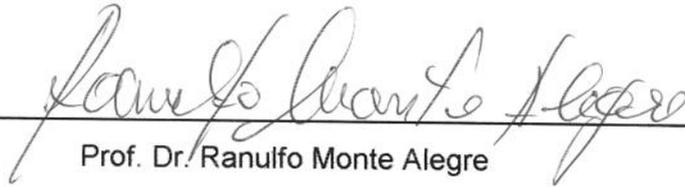
Campinas, 28 de fevereiro de 2003.

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA



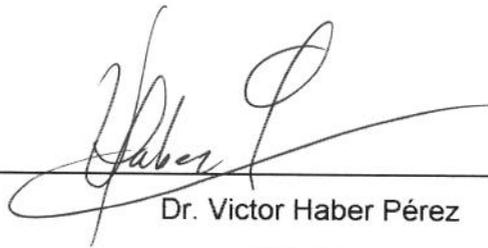
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Orientador



Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Membro



Dr. Victor Haber Pérez

Membro

Prof. Dr. Romildo Martins Sampaio

Membro

Campinas, fevereiro de 2003.

A história tem demonstrado que os mais notáveis vencedores normalmente encontram obstáculos dolorosos antes de triunfarem. Venceram porque se negaram a serem desencorajados por suas derrotas.

B. C. Forbes

Precisamos de homens que possam sonhar com coisas que nunca foram feitas.

John F. Kennedy

Dedico este trabalho à minha família. Meus pais, Dorival e Celita, que sempre me encorajaram, ampararam e apoiaram, depositando confiança e me dando forças para prosseguir, e aos meus irmãos, Marco Antônio e Marcelo Augusto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, agradeço a preciosa orientação, o conhecimento transmitido, a atenção dispensada e principalmente por despertar o instinto pesquisador. Muito obrigada pela presença, paciência, incentivo e apoio de todas as horas.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões que muito contribuíram a este trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pela convivência, pelos momentos descontraídos bem como pelo auxílio prestado na necessidade.

A todos os meus amigos, próximos ou distantes, que de alguma forma fizeram parte desta etapa da minha vida.

Ao Rafi, por tudo, especialmente por saber esperar.

A Deus.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Frutoligossacarídeos.....	4
3.1.1 Fontes de Frutoligossacarídeos.....	6
3.1.2 Produção de Frutoligossacarídeos.....	8
3.2 Levanasacarase	10
3.2.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	10
3.2.2 Caracterização da Levanasacarase.....	11
3.3 Enzimas Imobilizadas	13
3.3.1 Reatores.....	14
3.3.2 Imobilização por Adsorção.....	15
3.3.3 Suportes	16
3.4 Aplicação de Células ou Enzimas Imobilizadas na Produção de Frutoligossacarídeos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Microrganismo	20
4.2 Manutenção do Microrganismo.....	20
4.3 Preparo do Inóculo.....	21
4.4 Fermentação em Erlenmeyers.....	21
4.5 Seleção do Suporte para Imobilização da Enzima	21
4.5.1 Teste de Imobilização	22
4.5.2 Eficiência da Imobilização.....	22
4.6 Experimentos em Coluna.....	22
4.7 Métodos Analíticos.....	25

4.7.1	Determinação da Atividade Enzimática	25
4.7.2	Determinação de Açúcares Redutores (AR)	25
4.7.3	Determinação de Glicose	25
4.7.4	Determinação do pH	25
4.7.5	Cromatografia em Papel	26
4.7.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26
4.8	Determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR) e Número de Dispersão (D/ μ L)	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Microrganismo	29
5.2	Seleção do suporte	29
5.3	Experimentos em Coluna	34
5.3.1	Ensaio com Sacarose sem Reciclo	34
5.3.2	Ensaio com Sacarose e Frutose com Reator Operando em Reciclo	37
5.3.3	Cromatografia em Papel	40
5.3.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
5.4	Determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)	47
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	APÊNDICE	59
	APÊNDICE A - Curva Padrão para Análise de Açúcares Redutores (AR)	60
	APÊNDICE B - Concentração de Açúcares Redutores (AR) nos Ensaio E-I a E-XI Realizados Sem Reciclo	61
	APÊNDICE C - Concentração de Glicose e Açúcares Redutores (AR) para os Ensaio Com Reciclo	62
	APÊNDICE D - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	64
	APÊNDICE E - F(t) e E(t) Obtidos no Estudo da Distribuição do Tempo de Residência	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Esquema da produção de frutoligossacarídeos (1-kestose, nistose e frutossilnistose).....	5
Figura 3.2: Fluxograma dos métodos para imobilização de enzimas.	14
Figura 4.1: Esquema do reator de coluna.....	23
Figura 5.1:Atividade remanescente de enzima (UI) dos meios acrescidos de suporte com o tempo de imobilização (horas).	31
Figura 5.2: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 20% de açúcar [R-XII].	38
Figura 5.3: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 20% de açúcar [R-XIII].	38
Figura 5.4: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 30% de açúcar [R-XIV].	39
Figura 5.5: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 40% de açúcar [R-XV].	40
Figura 5.6: Cromatograma 1, onde são observadas da esquerda para direita os padrões F, G e S e as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.....	42
Figura 5.7: Cromatograma 2 onde são observadas da esquerda para direita os padrões F, G e S e as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	43
Figura 5.8: Curva F(t) versus tempo (min) para o ensaio de DTR 10.....	48
Figura 5.9: Curva F(t) versus tempo (min) para o ensaio de DTR 30.....	49
Figura 5.10: Curva F(t) versus tempo (min) para o ensaio de DTR 50.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Composição do meio de manutenção	20
Tabela 4.2: Composição do meio de fermentação.....	21
Tabela 4.3: Experimentos realizados sem reciclo e os respectivos percentuais de açúcar utilizados.....	24
Tabela 4.4: Experimentos realizados com reciclo e os respectivos percentuais de açúcar utilizados.....	24
Tabela 5.1: Atividade enzimática (UI) e o percentual de enzimas imobilizadas obtidas nos experimentos de seleção do suporte.....	30
Tabela 5.2: Atividade da enzima imobilizada (%).....	31
Tabela 5.3: Concentração de glicose (g/L) para os testes realizados sem adição de enzimas.....	32
Tabela 5.4: Valores médios das medidas de taxa mássica (TM) em função do “dial” da bomba obtidos durante os experimentos.....	34
Tabela 5.5: Concentração de glicose (g/L) nos ensaios E-I a E-VI realizados sem reciclo	36
Tabela 5.6: Concentração de glicose (g/L) nos ensaios E-VII a E-XI realizados sem reciclo.....	36
Tabela 5.7: Identificação das amostras apresentadas no cromatograma 1 Figura 5.6.....	41
Tabela 5.8: Identificação das amostras apresentadas no cromatograma 2 Figura 5.7.....	42
Tabela 5.9: Concentrações (p/v) de sacarose, frutose e glicose obtidos através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
Tabela 5.10: Concentrações (p/v) estimadas de 1-kestose.....	45
Tabela 5.11: Concentração de glicose (g/L) ao longo dos ensaios de DTR	47
Tabela 5.12: Tempo médio de residência (\bar{t}) e número de dispersão ($D/\mu\text{L}$) obtidos para determinação da DTR.....	50
Tabela 5.13: Valores obtidos para o cálculo do tempo de retenção hidráulico (t_h) e do tempo médio de residência (\bar{t}).....	51

RESUMO

Frutoligosacarídeos são oligômeros de frutose compostos principalmente de 1-kestose, nistose e frutossilnistose e podem ser produzidos a partir de sacarose através da ação de tranfrutosilação de enzimas obtidas de vários microrganismos e plantas. Frutoligosacarídeos são utilizados como adoçantes não digeríveis na alimentação humana e considerados fisiologicamente úteis por melhorar a população intestinal das bifidobactérias. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de frutoligosacarídeos a partir de levanasacarase de *Zymomonas mobilis* imobilizada em reator de coluna. Para imobilização da enzima foram testados suportes como carvão ativado, resinas de troca catiônica e aniônica. A eficiência do suporte foi avaliada através da determinação da atividade de levanasacarase no sobrenadante do meio fermentado acrescido do suporte. O carvão ativado foi selecionado como suporte para imobilizar a enzima, visto que se obteve 46,25% de imobilização de levanasacarase (0,1 UI da enzima imobilizados por grama de carbono) com retenção de 50% desta atividade. A síntese de frutoligosacarídeos foi realizada com a enzima imobilizada em reator de coluna (20 x 0,6 cm) e a temperatura da coluna foi mantida a 50°C. O reator foi alimentado com diferentes vazões, com soluções de sacarose de 10 a 50% operando sem reciclo e nas proporções 3:1 a 7:1 para sacarose e frutose operando com reciclo. A vazão de alimentação dentro dos limites estudados não apresentou influência sobre o comportamento hidrolítico e de tranfrutosilação da enzima. A síntese de 0,42% (p/p) de frutoligosacarídeos foi observada em sistemas com reciclo e frutose adicionada ao meio. A caracterização do reator de coluna foi realizada através da determinação da distribuição do tempo de residência (DTR), sendo observados tempos médios de residência de 4,31 a 16,03 minutos quando operado com vazões de 1,31 a 6,75 cm³/min, respectivamente.

Palavras chave: Frutoligosacarídeos, levanasacarase, enzima imobilizada e carvão ativado.

SUMMARY

Fructoligosaccharides are fructose oligomers and are mainly composed of 1-kestose, nystose and fructosilnystose, and can be produced from sucrose through the transfructosylating action of enzymes obtained from various microorganisms and plants. The mixture of fructoligosaccharides is used as nondigestible sweetener for humans and regarded to be physiologically useful because it improves the intestinal population of *Bifidusbacteria*. The continuous production of fructoligosaccharides can be achieved by using immobilized enzyme fructoligosaccharides-producing. The objective of this work was to study the fructoligosaccharides synthesis by immobilized levansucrase from *Zymomonas mobilis* CCT 4494 in column reactor. Several resins were tested for the immobilization: activated carbon, cationic and anionic-exchange resins. The carriers efficiency was evaluated through assay activity of levansucrase in the supernatant of the fermented medium. Activated carbon was selected for enzyme immobilization, since 46.25% of levansucrase was immobilized with this support with 50% retention of activity (0.1 IU immobilized enzyme per gram of carbon). The fructoligosaccharides synthesis was operated in column reactor (20 x 0.6 cm) through enzyme immobilization and the temperature of the column was maintained at 50°C. The column was fed with varied flow rates, with 10 to 50% sucrose solutions when operated without recycle. When operated with recycle, it was used sucrose and fructose solutions at the ratios of 3:1 and 7:1. The influence of varying flow rates was not observed in the hydrolytic and transfructosylating action of the enzyme. The synthesis of 0.42% (w/w) of fructoligosaccharides was observed at recycle systems when fructose was added. The column reactor was characterized by determination of distribution of residence time (RTD). It was observed average residence time as from 4.31 to 16.03 min with flow rate in the column varying from 1.31 to 6.75 cm³/min, respectively.

Key words: Fructoligosaccharides, levansucrase, *Zymomonas mobilis*, activated carbon.

1 INTRODUÇÃO

Açúcares como galactoligossacarídeos, isomaltoligossacarídeos, ciclodextrinas, palatinose e frutoligossacarídeos têm apresentado impacto significativo na indústria de alimentos, devido as suas excelentes vantagens funcionais, além de seus aspectos fisiológicos e físicos. Em particular, os frutoligossacarídeos têm se destacado devido a sua produção industrial ser relativamente simples, seu sabor ser semelhante ao da sacarose e possuir características fisiológicas específicas (Yun *et al.*, 1994). O interesse biológico pelos frutoligossacarídeos vem crescendo muito rapidamente, em vista dos mesmos apresentarem um papel importante em grande número de fenômenos de atuações específicas (Monsan e Paul, 1995).

Os frutoligossacarídeos têm atraído especial atenção na produção comercial em resposta a incrementos na demanda do consumo de alimentos considerados saudáveis (Chien *et al.*, 2001). Os frutoligossacarídeos são assim considerados pelo fato de promoverem o crescimento de microrganismos que contribuem para a modificação da microflora intestinal, ou seja, estimulam o aumento da população de bifidobactérias no intestino, visto que à medida que cresce o consumo de frutoligossacarídeos, ocorre um aumento dessas (Rodrigues, 2002).

As bifidobactérias são consideradas salutares em humanos, pois criam condições desfavoráveis ao desenvolvimento de espécies microbianas potencialmente patogênicas. As bifidobactérias exercem importante papel no controle do pH intestinal, restringindo o crescimento de bactérias patogênicas e putrefativas, além de limitar a produção de substâncias nocivas (Spiegel *et al.*, 1994). As bifidobactérias também produzem vitaminas, especialmente as do complexo B (Nestlé Clínica, 2002).

Recentemente, foi proposto classificar como fibras outros carboidratos com propriedades fisiológicas semelhantes àquelas das fibras, como os frutoligossacarídeos e outros açúcares que não são absorvidos. Frutoligossacarídeos apresentam potencial, através da fermentação, de aumentar o volume do trato intestinal, bem como acelerar seu trânsito no cólon, exercendo efeito modulador da flora intestinal. Além disso, podem facilitar a digestão e absorção de nutrientes no intestino e aumentar a absorção de cálcio e possivelmente de magnésio no cólon; estão também associados ao decréscimo nos níveis de triglicerídeos e colesterol do soro sanguíneo, existindo evidências preliminares

de que os frutoligossacarídeos podem diminuir os níveis de glicose do sangue (Nestlé Clínica, 2002).

Frutoligossacarídeos são oligômeros de frutose compostos principalmente de 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-β-frutofuranosilnistose (GF₄), e podem ser produzidos pela ação de transfrutossilacção de enzimas obtidas de várias plantas e microrganismos (Chien *et al.*, 2001). Os frutoligossacarídeos podem ser obtidos por fontes de origem vegetal e pela ação de microrganismos a partir da sacarose. A produção de frutoligossacarídeos a partir da sacarose pode ser obtida por conversão enzimática pelo uso de enzima solúvel ou imobilizada através de processos em batelada ou contínuo (Yun, 1996).

A vasta aplicação de frutoligossacarídeos em vários campos, particularmente na indústria de alimentos, como substituto pouco calórico da sacarose, bem como, aplicações na saúde (medicamentos, fenômenos inflamatórios, imunoestimulação), mostra a necessidade de se criarem métodos que os tornem facilmente acessíveis, assim como estudos para o aumento de escala destas sínteses (Monsan e Paul, 1995).

As enzimas que produzem frutoligossacarídeos são usualmente classificadas como β-D-frutofuranosidase (invertase EC 3.2.1.26), apesar das controvérsias entre muitos autores que as designam como frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) (Chien *et al.*, 2001).

Levanasacarase (EC 2.4.1.10) é uma frutossiltransferase que forma levana pela conversão de sacarose e/ou rafinose. Além de formar levana a enzima catalisa outras reações como a inversão de sacarose, formando oligossacarídeos e outras reações de transfrutossilacção (Kim *et al.*, 2000). A síntese de frutoligossacarídeos como 1-kestose por levanasacarase de *Zymomonas mobilis* é relatada em estudos realizados por Crittenden e Doelle (1993).

Wendt (2001) verificou a presença de levana de baixo peso molecular em fermentações realizadas a partir de mutante de *Zymomonas mobilis*. Estudos realizados por Jang *et al.* (2000) e Jang *et al.* (2001) com levanasacarase de *Zymomonas mobilis* demonstraram que a enzima imobilizada favorece a formação de levana de baixo peso molecular, quando comparada com a enzima livre.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudo da produção de frutoligosacarídeos a partir de levanasacarase de *Zymomonas mobilis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Seleção de suportes para imobilização de levanasacarase;
- Estudo da síntese de frutoligosacarídeos usando levanasacarase imobilizada em reator de coluna, onde foi avaliada a concentração de sacarose e sacarose mais frutose na alimentação do reator, bem como, a vazão de alimentação;
- Determinação da distribuição do tempo de residência e do número de dispersão axial do reator de coluna com a finalidade de caracterizar o reator.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Frutoligosacarídeos

Os frutoligosacarídeos correspondem a uma classe de açúcares constituídos de 1 a 3 moléculas de frutose ligadas a uma molécula de sacarose com ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) (Hidaka *et al.*, 1988). Seus principais constituintes são 1-kestose, nistose e 1-frutosilnistose, que são oligômeros de 1^F - (1- β -frutofuranosil)_{n-1} sacarose, onde n pode variar de 2 a 4, sendo, n = 2, 1-kestose (GF₂); n = 3, nistose (GF₃); n = 4, 1-frutosilnistose (GF₄) (Oku *et al.*, 1984).

Frutoligosacarídeos têm atraído especial atenção tanto de pesquisadores e consumidores, bem como produtores comerciais, em vista do aumento da demanda no consumo de alimentos saudáveis ou ingredientes de alimentos considerados saudáveis, como são designados os frutoligosacarídeos de acordo com a legislação vigente (Chien *et al.*, 2001).

Os frutoligosacarídeos produzidos comercialmente apresentam de 40 a 70 % do poder edulcorante da sacarose (Cândido e Campos, 1996), proporcionam maior suavidade como adoçantes quando comparados com a sacarose, possuem baixo valor calórico e não são cariogênicos (Wang e Rakshit, 2000), além de não serem digeríveis no intestino delgado e estimular a flora microbiana intestinal, sendo seletivamente utilizados pelas bactérias do cólon, especialmente pelas bifidobactérias que hidrolisam estes açúcares (Oliveira, 1997).

As bifidobactérias, microrganismos anaeróbicos não formadores de esporos e gram-positivos, ocorrem naturalmente no intestino humano, trazendo uma série de benefícios para a saúde (Modler, 1994). A ingestão de frutoligosacarídeos estimula o aumento da população de bifidobactérias do cólon, que é numérica e fisiologicamente o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal, visto que atuam com conseqüente supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas existentes no intestino grosso, restringindo, portanto, a formação de toxinas e outras substâncias nocivas ao ser humano (Gibson e Wang, 1994).

De acordo com Yun (1996) os frutoligosacarídeos podem ser produzidos pela reação de transfrutossilacção em muitas plantas e microrganismos; dependendo das fontes de enzima eles possuem diferentes tipos de ligações.

A Figura 3.1 mostra o esquema da produção enzimática de frutoligosacarídeos, a partir da frutossiltransferase, onde a enzima transfere o resíduo frutossil da molécula da sacarose doadora para a molécula da sacarose acceptora (Santos, 1998).

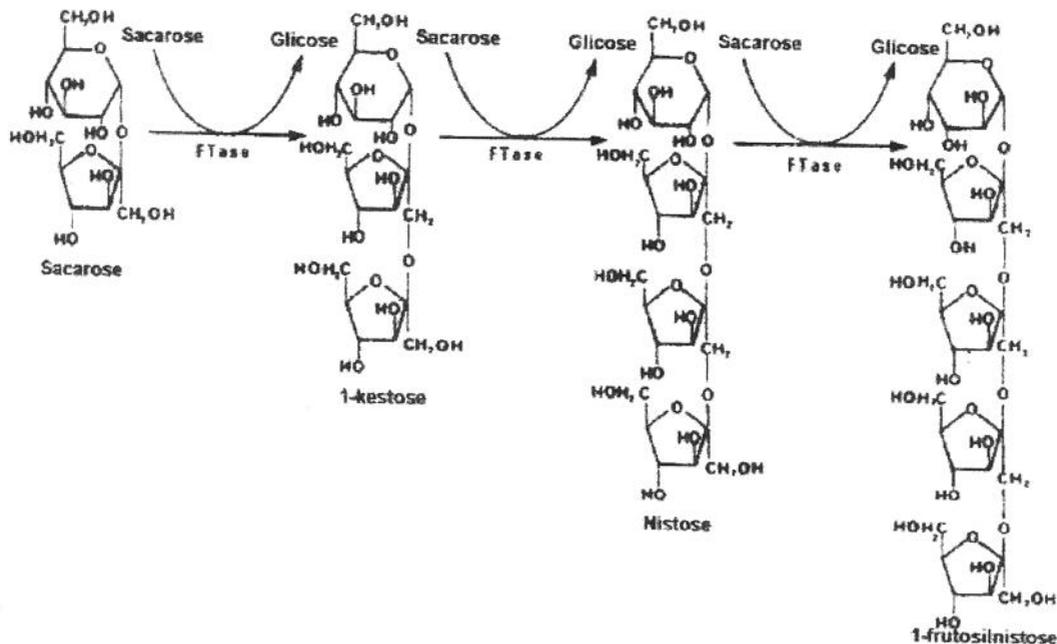


Figura 3.1: Esquema da Produção de Frutoligosacarídeos (1-kestose, nistose e frutossilnistose). Fonte: Santos, 1998.

Estudos indicam que os frutoligosacarídeos têm efeito favorável no metabolismo de carboidratos e lipídios, semelhante às fibras na dieta (Spiegel *et al.*, 1994 e Modler, 1994). Outros benefícios associados à ingestão de frutoligosacarídeos na microflora intestinal, são: a diminuição do pH intestinal, redução da constipação intestinal e decréscimo nos níveis de triglicerídeos e colesterol do soro sanguíneo (Cândido e Campos, 1996).

Estudos em animais demonstraram que diversos carboidratos fermentáveis não digestíveis, como os frutoligosacarídeos, podem melhorar a absorção de minerais no intestino. Embora hajam relatos sobre a absorção de cálcio em seres humanos, existe pouca informação disponível no que diz respeito ao magnésio. Em recente estudo, pesquisadores verificaram que suplementos de frutoligosacarídeos provocaram um aumento de 12 % na absorção de magnésio em mulheres após a menopausa (Fortifacts, 2002).

São consideradas substâncias prebióticas aquelas que promovem o crescimento de microrganismos que contribuem para a modificação da microflora intestinal, como por exemplo os frutoligosacarídeos. A Associação Dietética Americana (ADA) apresenta níveis de ingestão de alimentos ou componentes de alimentos funcionais para promover ótimo estado de saúde, dentre os quais encontram-se os frutoligosacarídeos (prebióticos) num nível de 3 a 10 g/dia para reduzir pressão sanguínea, produzir efeitos benéficos no metabolismo de lipídios, reduzir colesterol sérico e melhorar funções gastrointestinais (Rodrigues, 2002). Também quanto à recomendação do uso diário de prebióticos como frutoligosacarídeos, Carrano (2002) cita estudos que variam de 8 a 10 g/dia. A Nestlé Clínica registra que embora não haja nenhuma recomendação dietética formal para frutoligosacarídeos, estudos recentes sugerem que cerca de 10 g/dia constitui uma dose ideal e bem tolerada.

3.1.1 Fontes de Frutoligosacarídeos

Os frutoligosacarídeos podem ser obtidos por fontes de origem vegetal, sendo encontrados numa grande variedade de vegetais utilizados como fonte de alimento animal e humano, podendo também ser obtidos a partir da sacarose, pela ação de microrganismos (Spiegel *et al.*, 1994).

Como fontes naturais de frutoligosacarídeos Modler (1994) cita: chicória, tubérculos alcachofra-de-jerusalém, dália, cebola e alho, sendo ainda encontrados, segundo Cândido e Campos (1996), em alimentos como mel, açúcar mascavo, banana e tomate. A quantidade de frutoligosacarídeos, bem como, o grau de polimerização variam grandemente com a fonte.

Spiegel *et al.* (1994) e Modler (1994) constataram que, apesar de alimentos naturais conterem frutoligosacarídeos e, considerando os hábitos alimentares usuais,

torna-se difícil a ingestão da dose diária recomendada de frutoligossacarídeos a partir de alimentos naturais.

Os frutoligossacarídeos de origem microbiana são obtidos a partir da enzima β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26), ou pela enzima β -frutosiltransferase (β -D-frutofuranosídeo frutosiltransferase, E.C. 2.4.1.9) (Chang *et al.*, 1994). Wang e Rakshit (2000) relataram que o processo de transferência de unidades não redutoras de glicose ou frutose da sacarose para a molécula aceptora pode ser realizada por um grande número de enzimas, incluindo glicosiltransferase, frutosiltransferase, α -glicosidase, β -frutofuranosidase, neopullulanase, amilase maltogênica e outras enzimas transferases, sendo a forma de agir diferenciada para cada uma das enzimas.

Chien *et al.* (2001) constataram controvérsias quanto à classificação das enzimas produtoras de frutoligossacarídeos, que usualmente são classificadas como β -D-frutofuranosidase (invertase EC 3.2.1.26), apesar do fato de muitos autores as designarem como frutosiltransferases (EC 2.4.1.9). A primeira designação que é também a mais antiga, ocorre provavelmente devido ao fato da atividade de transfrutossilacção ter sido originalmente observada em invertases quando agiam em altas concentrações de sacarose.

Os três isômeros encontrados na natureza e identificados como 1-kestose (1^F - β -frutosilsacarose), 6-kestose (6^F - β -frutosilsacarose) e neokestose (6^G - β -frutosilsacarose), são potencialmente intermediários na síntese de oligo e polifrutanas. Frutanas são oligo e polissacarídeos de frutose contendo uma única molécula de glicose. São denominadas inulinas quando β -(2 \rightarrow 1) ligações glicosídicas predominam ou levanas, quando β -(2 \rightarrow 6) ligações glicosídicas estão presentes. Muitas enzimas que produzem frutanas são relatadas: a inulosacarase (E.C. 2.4.1.9), que converte a sacarose em frutanas (inulina) com β -(2 \rightarrow 1) ligações e D-glicose, e a levanasacarase (E.C. 2.4.1.10), que converte a sacarose em frutanas (levanas) com ligações β -(2 \rightarrow 6) (van Balken *et al.*, 1991). A primeira etapa na síntese de frutanas é catalisada pela sacarose frutosiltransferase, que transfere grupos frutosila da sacarose (doador) para sacarose (aceptor) produzindo trissacarídeo e glicose (Cheetham *et al.*, 1989).

A β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase) é uma enzima presente em plantas, animais e microrganismos, apresenta ação hidrolítica (U_h) e de

transfrutossilacção (U_i) a partir da sacarose. A especificidade do acceptor para a reacção de transfrutossilacção e as estruturas dos produtos transfrutossilados variam dependendo da fonte da enzima. Os doadores e aceptores dos grupos frutosila podem ser a sacarose ou outros frutoligossacarídeos, rafinose, lactose e melezitose (Fujita *et al.*, 1994). Para se obter uma produção eficiente de frutoligossacarídeos, é importante que o microrganismo apresente alta proporção U_i/U_h e alta produtividade enzimática (Hidaka *et al.*, 1988 e Chang *et al.*, 1994).

A reacção de transfrutossilacção, responsável pela produção de frutoligossacarídeos, é quantitativamente diferente entre as diferentes linhagens microbianas, sendo que o aumento da concentração do substrato favorece este tipo de reacção. Durante a reacção, observa-se uma competição entre a água e outros substratos pela transferência de radicais frutossil nas reacções catalisadas pelas enzimas β -frutofuranosidases (Hirayama *et al.*, 1989).

3.1.2 Produção de Frutoligossacarídeos

Frutoligossacarídeos obtidos a partir da sacarose através da acção de microrganismos, têm tido crescente importância industrial devido a sua produção ser relativamente simples, seu sabor ser semelhante ao da sacarose e ser um adoçante de baixo teor calórico, além de não digeríveis no intestino humano (Yun *et al.*, 1994).

Os frutoligossacarídeos estão sendo comercialmente produzidos a partir da sacarose, através do uso de enzimas solúveis ou células imobilizadas (Yun *et al.*, 1990). Segundo Yun (1996) há dificuldade em atender ao aumento na demanda por frutoligossacarídeos através destes processos, ou seja, sistemas em batelada com enzima solúvel apresentam baixa produtividade, enquanto sistemas contínuos com células imobilizadas possuem baixa operacionalidade. Conforme o autor, deve-se salientar que a produtividade é obviamente o fator crítico para a produção comercial de frutoligossacarídeos.

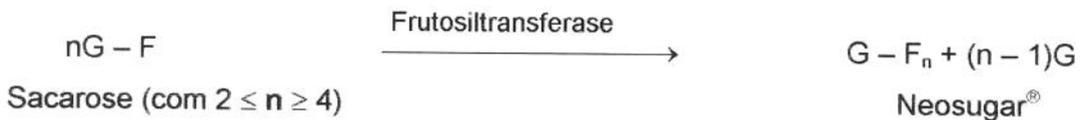
Chien *et al.* (2001) relatam que a produção contínua de frutoligossacarídeos pode ser realizada através do uso de células ou enzimas imobilizadas que sejam capazes de produzir frutoligossacarídeos. Duas companhias, uma japonesa e outra coreana, usam diferentes processos comerciais envolvendo o uso de células imobilizadas de *Aspergillus*

niger e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente, ambas retendo as células em gel alginato de cálcio.

Comercialmente vêm sendo produzidos frutoligossacarídeos conhecidos como Nutraflora[®] pela Golden Technologies Inc. no Colorado - EUA (Cândido e Campos, 1996) e Neosugar[®] pela Meiji Seika Kaisha Ltda no Japão, companhia esta que introduziu no mercado os frutoligossacarídeos comerciais em 1984, sendo o Japão país que possui vasto mercado comercial de frutoligossacarídeos (Yun, 1996).

Neosugar[®] é uma mistura de glicose, sacarose e frutoligossacarídeos contendo resíduos frutofuranosil com ligações $\beta(2 \rightarrow 1)$ com unidades de glicose terminal (1-kestose, nistose e frutossilnistose). Glicose e frutose podem ser removidas da mistura por cromatografia de troca iônica para a obtenção de um produto com maior concentração de frutoligossacarídeos (Monsan e Paul, 1995).

A companhia japonesa Meiji Seika têm desenvolvido a síntese de oligossacarídeos não redutores conhecidos como Neosugar[®] usando frutossiltransferase isolada de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* (Monsan e Paul, 1995), de acordo com a reação (G = glicose e F = frutose):



Nutraflora[®] é uma das formas mais puras de frutoligossacarídeos de cadeia curta disponível no mercado e consiste em um ingrediente alimentício versátil e com características nutracêuticas. Nutraflora[®] é reconhecido como um ingrediente seguro para todos os grupos populacionais. De fato, Nutraflora[®] é reconhecido como GRAS ("Generally Recognized As Safe") pelo FDA em 18 categorias alimentícias (GTC Nutrition, 2002).

3.2 Levanasacarase

Conforme Chambert e Gonzy-Tréboul (1976) a levanasacarase é uma frutossiltransferase que catalisa principalmente a seguinte reação: sacarose +ceptor → glicose +ceptor-frutossil, sendo identificada como sacarose 2,6-β-D-frutana 6-β-frutossil-transferase (EC 2.4.1.10).

A levanasacarase converte a sacarose em frutanas com pontes β(2→6) na ramificação principal (Hestrin *et al.*, 1956) e, entre as frutanas obtidas encontra-se a levana (van Balken *et al.*, 1991). A levanasacarase transfere o radical frutossil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor formando a cadeia da levana (Dedonder, 1966).

A levanasacarase pode ser produzida por diversos gêneros de bactérias como *Pseudomonas sp.*, *Acetobacter acetii* e *Aerobacter levanicum* (*Erwinia herbicola*) (Cote, 1988), *Bacillus natto's* e *Bacillus polymyxa* (Kojima *et al.*, 1993), sendo *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* as mais estudadas para este fim.

Estudos com levanasacarase de *Zymomonas mobilis* são relatados por Crittenden e Doelle (1993), Sprenger (1996), Kannan *et al.* (1997), Kannan *et al.* (1998), Sangiliyandi e Gunasekaran (1998), Lee *et al.* (2000), Jang *et al.* (2001) e Bekers *et al.* (2001).

3.2.1 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas são bastonetes gram negativos não formadores de esporos, móveis e anaeróbios, mas que toleram algum oxigênio. Podem crescer a baixos valores de pH; entretanto o pH ótimo para crescimento é 7,3, e o pH final após 3 dias a 30°C está entre 4,8 a 5,2. A temperatura na qual as células de *Zymomonas* podem crescer é de 25 a 30°C (Swings e de Ley, 1977).

Para o seu cultivo, *Zymomonas mobilis* precisa de um açúcar fermentescível como fonte de carbono no meio de cultura. Quando glicose é utilizada como substrato em condições anaeróbias, o principal produto do catabolismo é o etanol, com rendimentos próximos ao teórico (Lee *et al.*, 2000). Porém, quando sacarose ou glicose mais frutose são utilizados como fonte de carbono, a eficiência da conversão de etanol é reduzida significativamente devido à formação de subprodutos, principalmente levana e sorbitol (Sprenger, 1996 e Lee *et al.*, 2000).

Estudos sobre o metabolismo da *Zymomonas mobilis* têm revelado a presença de três diferentes enzimas quando esta cresce em sacarose, convertendo o dissacarídeo em glicose e frutose (Sprenger 1996); uma sacarase intracelular (SacA), cuja função ainda não é claramente compreendida, a levanasacarase (SacB) e uma sacarase extracelular (SacC). A sacarase extracelular é a principal responsável pela hidrólise da sacarose, enquanto a levanasacarase é comprometida na formação de levana e oligossacarídeos de frutose (Kannan *et al.*, 1997). A síntese de levana e sorbitol são antagônicas, pois formação de levana depende da presença de monossacarídeos livres, especialmente a frutose formada após hidrólise da sacarose. Altas taxas de hidrólise da sacarose favorecem a síntese de levana, enquanto baixas taxas de hidrólise favorecem a formação de sorbitol (Kannan *et al.*, 1998).

3.2.2 Caracterização da Levanasacarase

A formação de levana durante a fermentação da sacarose indica a presença da enzima levanasacarase, que pode ocorrer intracelularmente como constituinte da célula e/ou extracelularmente (Cote, 1988), transferindo o radical frutossil da sacarose para formar a levana (Euzenat *et al.*, 1997).

Dedonder (1966) observou que a enzima levanasacarase é termolábil e que sua atividade é instantaneamente reduzida a metade se colocada a 60°C, no entanto a adição de metais como ferro, alumínio e zinco aumentam esta estabilidade. A influência da temperatura na atividade da levanasacarase de *Zymomonas mobilis* foi observada por Wendt (2001), que avaliou o comportamento da atividade sob temperaturas de 30 a 80°C, verificando que a enzima apresentou maior atividade a 50°C e inibição da atividade a partir de 65°C. Belghith *et al.* (1996) observaram um incremento na formação de levana de alto peso molecular à baixas temperaturas, já a proporção de levanas de baixo peso molecular aumentou com o incremento na temperatura de incubação.

Quanto a atividade da levanasacarase em relação ao pH, Park *et al.* (1983) verificaram que o pH ótimo da enzima de *Zymomonas mobilis* NRRL B-806 está entre 4,7 e 5,6. Preziosi *et al.* (1989) observaram que, para cepas ZM4, o melhor pH é de 5,5; este mesmo valor de pH também foi identificado como ótimo por Crittenden e Doelle (1994) para levanasacarase de *Zymomonas mobilis*. Já nos ensaios desenvolvidos por Belghith

et al. (1996) e Sangiliyandi e Gunasekaran (1998), o pH ótimo para levanasacarase de *Zymomonas mobilis* foi 5,0.

A concentração inicial de sacarose influencia a atividade enzimática da levanasacarase; maiores concentrações proporcionam aumento na atividade; como verificado por Wendt (2001), que obteve aumento de aproximadamente 30% na atividade da enzima quando a concentração de sacarose passou de 20 para 40%, em reações mantidas sob as mesmas condições. Crittenden e Doelle (1994) assim como Belghith *et al.* (1996) também verificaram a mesma influência na atividade da levanasacarase de *Zymomonas mobilis* com o incremento da concentração do substrato sacarose. Nos estudos relatados verificou-se que com o incremento da concentração de sacarose houve redução na formação de levana de alto peso molecular, fato ocorrido devido a formação de levana de baixo peso molecular e oligossacarídeos.

Euzenat *et al.* (1997) confirmaram que a levana atua diretamente sobre a enzima, isto é, a produção de levana de baixo peso molecular induziu um incremento na atividade de levanasacarase, uma vez que os melhores aceptores são os resíduos frutossil ao invés da água ou glicose.

A frutossiltransferase levanasacarase além de formar levana a partir de sacarose, catalisa outras reações como a inversão de sacarose, formação de oligossacarídeos e outras reações de transfrutossilção (Kim *et al.*, 2000). Levanasacarase de *Zymomonas mobilis*, conhecida pela sua habilidade de produzir etanol (Vilkari, 1984), foi também identificada como responsável pela formação de frutoligossacarídeos a partir de reações de transfrutossilção em sacarose (Crittenden e Doelle, 1993). Estes autores comprovaram a habilidade de levanasacarase (E.C. 2.4.1.10) de *Zymomonas mobilis* ATCC 39676 para produzir frutoligossacarídeos, quando identificaram 1-kestose como o produto formado em maior proporção pela transfrutossilção da levanasacarase, representando 98% do total dos oligossacarídeos produzidos, evidenciando assim, maior versatilidade para aplicação industrial de levanasacarase de *Zymomonas mobilis*.

3.3 Enzimas Imobilizadas

Sistemas com enzimas imobilizadas são amplamente utilizados em processos de reação para produção industrial, são sistemas bem caracterizados e apresentam vantagens como o reuso do biocatalisador, a estabilidade deste é acentuada além de ser facilmente separado (Jang *et al.*, 2001).

Zaborsky (1973) já havia mencionado que a utilização de enzimas imobilizadas apresenta considerável vantagem sobre enzimas solúveis, pelo fato de poderem apresentar seletivamente propriedades físicas e/ou químicas alteradas, bem como serem passíveis de reuso, permitirem formação controlada de produto e as reações enzimáticas ocorrerem com maior rapidez, sendo possível obter alta eficiência em múltiplas e consecutivas reações, além da grande variedade de projetos de engenharia para processos contínuos e batelada.

Conforme Keyes (1984) citado por Reguly (2000), as enzimas imobilizadas são geralmente mais estáveis que as mesmas enzimas sob forma solúvel; mesmo quando suspensas em água, estas enzimas insolubilizadas por imobilização permanecem estáveis e ativas por meses, possibilitando assim o seu reuso. No entanto, Jang *et al.* (2001) observaram que a imobilização também pode afetar a estabilidade da enzima, visto que pode alterar o microambiente da mesma e desta forma afetar sua atividade.

A aplicação de processos com enzimas imobilizadas nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, deve-se, principalmente, ao fato da solução processada não ser contaminada com a enzima, além da reação poder ser interrompida rapidamente (Fogarty, 1990).

Existem várias maneiras de classificar os muitos tipos de enzimas imobilizadas, cuja classificação deve no entanto, estar baseada na combinação da natureza da interação responsável pela imobilização e da natureza do suporte (Wiseman, 1985). Os métodos de imobilização de enzimas, apresentados na Figura 3.2, são classificados por Reguly (2000) como sendo:

- de natureza físico-química: aqueles que envolvem ligações covalentes, iônicas ou interações mais fracas entre suporte-enzima ou enzima-enzima;
- de natureza física: aqueles que não envolvem ligações, havendo uma simples inclusão ou oclusão de enzimas no suporte.

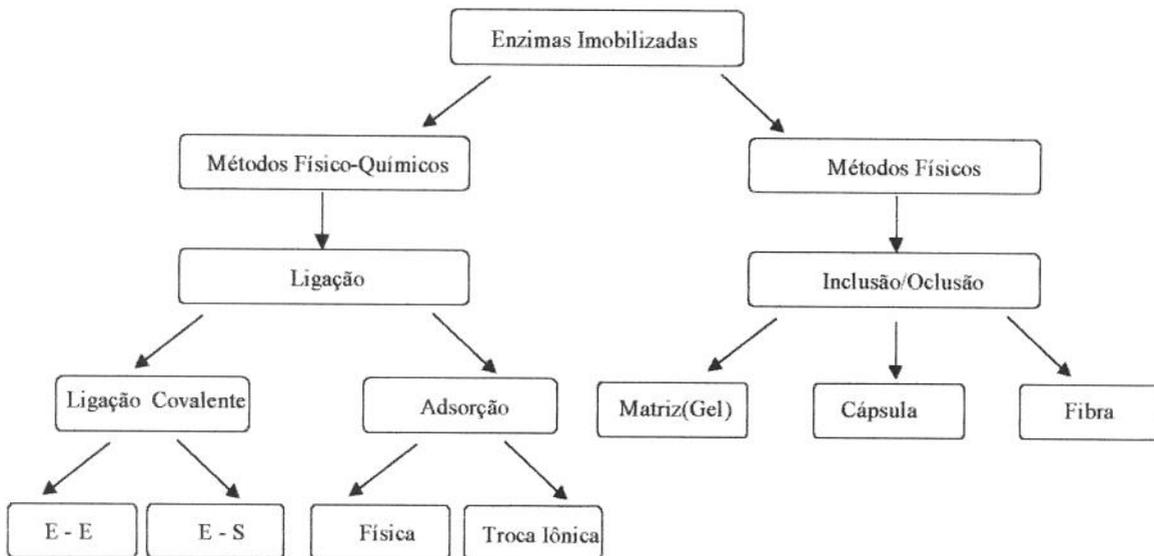


Figura 3.2: Fluxograma dos métodos para imobilização de enzimas. Onde: E-E (enzima-enzima); E-S (enzima-suporte).

3.3.1 Reatores

Os reatores em que se processam as reações catalisadas por enzimas imobilizadas devem colocar as mesmas em contato com o substrato e conter o produto da reação. O tipo de reator determina, em grande parte, o método a ser usado para imobilização das enzimas, principalmente sua escala ou tamanho, devido a fatores como taxa de escoamento, agitação, fricção e compressão, a que o conjunto suporte-enzima está sujeito no reator. De outra parte, o método de imobilização depende também da natureza da enzima (Reguly, 2000). Conforme o autor, os reatores podem ser classificados em tanques-reatores, de regime contínuo ou descontínuo, com e sem agitação; e reatores de coluna, de leito fixo totalmente empacotado ou apenas um disco empacotado, coluna tubular e de leito fluidizado.

Chien *et al.* (2001) estudaram e compararam o uso de sistemas em batelada e contínuo para a produção de frutoligossacarídeos através de sistemas com enzima (β -D-frutofuranosidase) e/ou células (*Aspergillus japonicus*) imobilizadas, e verificaram que a

produção de frutoligossacarídeos foi muito similar; contudo, salientaram que o reator de coluna operado continuamente manteve alto rendimento por longo período de uso quando alimentado em baixas vazões. Ettalibi e Baratti (2001) avaliaram o uso de reatores operando em batelada e contínuo, quando otimizaram a imobilização de inulinase em vidro poroso, sendo também observada por estes autores alta estabilidade operacional quando o reator contínuo foi testado em baixas vazões.

A escolha do reator depende da quantidade, natureza e características do substrato e produto da reação (densidade, viscosidade e concentração); das condições da reação (pH, temperatura e concentração iônica); da velocidade de alimentação e da vazão do substrato e produto (Reguly, 2000).

3.3.2 Imobilização por Adsorção

A imobilização por adsorção é a técnica mais simples e a de menor custo, visto que não requer reagentes e apenas um mínimo de ativação das enzimas (Reguly, 2000). Além disso, a adsorção é um método brando, causando pequena ou nenhuma inativação das enzimas (Zaborsky, 1973). Em princípio, o método é completamente reversível, permitindo o reuso de suporte e catalisador. Segundo Bernath (1986) citado por Reguly (2000), possivelmente a maior vantagem comercial da imobilização por adsorção é a capacidade de regenerar a atividade da enzima no próprio reator.

Apesar da operacionalidade relativamente simples, o uso eficaz da técnica depende de variáveis experimentais como natureza do solvente, quantidade de enzima e adsorvente, força iônica, pH, temperatura e tempo. A quantidade de enzima adsorvida pela superfície do suporte é influenciada pela concentração de enzima exposta na solução durante o processo de imobilização; maiores atividades são obtidas a partir de soluções com alta concentração enzimática (Wiseman, 1985).

A imobilização por adsorção pode ocorrer por interação físico-química não específica, através de forças de van der Waals, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas; ou por interação de cargas iônicas através de pontes salinas (Reguly, 2000).

3.3.3 Suportes

O problema para desenvolver-se adsorventes efetivos para substâncias biologicamente ativas, incluindo microrganismos, ainda é relevante. Em alguns casos é esperada efetividade do adsorvente como material filtrante (requerido para problemas ecológicos como por exemplo a purificação de águas residuárias). Em outros casos, o adsorvente deve ser passível de uso em indústrias biológicas e farmacêuticas como suporte para imobilização de enzimas e células bacterianas (Kovalenko *et al.*, 2001).

O material empregado como suporte para ser considerado um bom adsorvente deve suprir certos critérios. Primeiro, deve ter suficiente capacidade de adsorção com respeito às substâncias biologicamente ativas (SBA) e firmeza para ligar-se a elas na superfície. Segundo, precisa reter e estabilizar a atividade de SBA imobilizadas com um nível relativamente alto. Terceiro, precisa apresentar boas características operacionais (força ou potência mecânica, parâmetros hidrodinâmicos e resistência à degradação química e biológica). Finalmente, seu custo deve ser relativamente baixo. Materiais inorgânicos que são largamente empregados na ecologia e nas indústrias, são os que melhor satisfazem estes requerimentos (Kovalenko *et al.*, 2001).

É notável que nas aplicações biotecnológicas os suportes usados com mais frequência para imobilização de bactérias são materiais silicados (areias, argilas, vidros, minerais) e carvão ativado com microporos. Em alguns estudos, adsorventes como carvão com porosidade média e carvão mineral, mostraram ter ótimas propriedades para adsorção de enzimas e bactérias em comparação com suportes minerais como sílica e óxidos metálicos (Kovalenko *et al.*, 2001).

O suporte ideal para uma dada aplicação é aquele que aumenta a afinidade da enzima pelo substrato, diminui a inibição pelo produto, dificulta o crescimento microbiano e pode ser recuperado para reuso (Wiseman, 1985). Para ser utilizado em um reator, o suporte deve ser estável na solução, bem como, não deteriorar nas condições de reação; logo, deve apresentar durabilidade química e estabilidade térmica. Os suportes inorgânicos são os que melhor cumprem os requerimentos para aplicações industriais (Messing, 1975).

A alumina (Al_2O_3) um suporte inorgânico de baixo custo e facilmente obtida, é popularmente utilizada como adsorvente industrial e suporte em catálises heterogêneas.

Durante os últimos 20 anos, alumina vem sendo empregada como suporte para adsorção de microrganismos e enzimas (Bekers *et al.*, 2001).

Uma vasta opção de suportes de diferentes cargas e formas físicas estão disponíveis, a maioria apresentando superfícies tratáveis (Fogarty, 1990). O tratamento químico das esferas de arame de aço puro (WS) com $TiCl_4$, assim como através de flambagem por chama direta, aumentou as ligações entre as células e a superfície do suporte, além de estimular a síntese de produtos. Em outras investigações mostrou-se que modificações da superfície de WS influenciaram significativamente na formação de ligação com as células, como quando usado com *Saccharomyces cerevisiae* (Bekers *et al.*, 2001).

Os materiais indicados como suportes para imobilização por adsorção, podem ser, aqueles que adsorvem as enzimas por interação físico-química não específica como, alumina, sílica, bentonita, carvão ativado e vidro poroso; ou aqueles que adsorvem as enzimas por interação de cargas iônicas, celuloses, dextranas ativadas, colágeno, quitina e resinas de troca iônica, como Amberlite, Dowex, Permutit e Wofatit (Reguly, 2000).

Carvão ativado é uma forma microcristalina não grafitica de carbono que tem sido processado para aumentar sua porosidade interna, o que resulta em grande área de superfície que possibilita a absorção de gases e vapores de compostos gasosos, dissolvidos ou dispersos em substâncias líquidas. O processamento é realizado por adsorção. A ligação de impurezas por forças físicas ocorre dentro da estrutura porosa do carvão, devido às moléculas da superfície exercerem forças atrativas de London ou de van der Waals. Carvão ativado tem um dos maiores volumes de porosidade adsortiva dentre os materiais conhecidos pelo homem. Por causa desta grande área superficial (1 quarto de grânulos = 6 campos de futebol), carvão ativado mostra uma notável habilidade de adsorver moléculas orgânicas de líquidos ou vapores (Roy, 1995).

Os tamanhos dos poros do carvão ativado são geralmente divididos em 3 categorias: macro, meso e microporos. Os diâmetros dos poros variam de 1000 a 100 000 Å para macroporos, de 100 a 1000 Å para os mesoporos e menores que 100 Å para os microporos. Uma vez que os poros são preenchidos, outras regenerações ou reativações podem proporcionar um carvão reutilizável com muitas de suas propriedades mantidas como as de um carvão virgem (Roy, 1995).

O carvão ativado é um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas em larga escala por adsorção, sendo limitado apenas quanto às complicações devido à desadsorção (Roy, 1995).

3.4 Aplicação de Células ou Enzimas Imobilizadas na Produção de Frutoligossacarídeos

Ao contrário de muitas enzimas, levanasacarase é limitada, visto que cataliza reações sintéticas de micromoléculas (sacarose) em macromoléculas (levanas e outras frutanas). Com o intuito de avaliar as propriedades da enzima e as características dos produtos formados, Jang *et al.* (2001) imobilizaram levanasacarase de *Zymomonas mobilis* em magnetita titânio ativada e compararam com a enzima livre, verificando que a imobilização incrementou a estabilidade térmica e reduziu a atividade de polimerização da enzima relativa à atividade de hidrólise da sacarose, permitindo desta forma mudanças no tamanho da estrutura da levana. Concluíram desta maneira que a produção de levana com alto rendimento e baixo peso molecular é possível através do uso de levanasacarase imobilizada.

Levanasacarase de *Bacillus natto* foi imobilizada em suporte cerâmica SM-10 por Iizuka *et al.* (1993) com o objetivo de produzir levana. O suporte SM apresentava área superficial de 100 m²/g e diâmetro dos poros igual a 365 Å. A imobilização da enzima no suporte deu-se através de imersão, ou seja, o suporte foi imergido em solução contendo a enzima, durante 6 horas, com pH mantido em 6,0 e sob refrigeração. O rendimento da síntese foi de 7,5 g de levana por 100 g de sacarose, sendo o mesmo repetido por várias vezes.

Jang *et al.* (2000) imobilizaram levanasacarase de *Zymomonas mobilis* em hidroxiapatita e verificaram que a enzima imobilizada manteve suas propriedades bioquímicas; além disso, a levanasacarase imobilizada reteve 65% da sua atividade original após seis intervalos de uso repetitivo e 67% da atividade inicial após 40 dias estocada a 4°C.

Alginate de cálcio foi empregado na imobilização de *Aspergillus japonicus* em pesquisas realizadas por Cruz *et al.* (1998) para produção de frutoligossacarídeos. O sistema foi conduzido em batelada, em fermentadores de 2 litros a 55°C e pH 5,0-5,6. Considerando que geralmente o total de frutoligossacarídeos obtidos através de enzimas

ou células livres ou enzimas imobilizadas de outros microrganismos têm sido de 55 a 60%, por meio de soluções com 30 a 50% de sacarose, em aproximadamente 24 horas, os autores observaram que, com 65% de sacarose num tempo de reação 4 horas o produto final obtido apresentava 61,3% de frutoligossacarídeos, verificando desta forma uma alta taxa de conversão através de uma reação de curto tempo. Além disso, o micélio se manteve ativo por um longo período e após 23 bateladas com 92 horas de uso repetitivo não haviam sido verificadas perdas de atividade, permitindo afirmar que o estudo apresenta grande potencial para uso industrial.

β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* foi imobilizada em vidro poroso ativado com glutaraldeído por Hayashi *et al.* (1991). A reação ocorreu em coluna empacotada (com 6 mm de diâmetro interno e volume igual a 0,6 cm³), que foi alimentada com solução de sacarose 40% (p/v). Quando operaram o sistema em batelada, obtiveram vários frutoligossacarídeos como 1-kestose, nistose e frutossilnistose. Já em sistema contínuo, produziram seletivamente 1-kestose, quando operaram o sistema com vazão de 20 cm³/h.

A produção de frutoligossacarídeos a partir da hidrólise da sacarose pela β -D-frutofuranosidase foi obtida por Chien *et al.* (2001), que utilizaram associação células-enzimas do micélio de *Aspergillus japonicus* imobilizado em glúten. O sistema utilizado mostrou-se efetivo na produção de frutoligossacarídeos, além de apresentar-se estável por longo período em operação, mostrando-se viável para uso em escala industrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizada cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, conservada em laboratório. Para obtenção da cepa mutante, Wendt (2001) tratou a massa celular da cepa natural com 50µg/mL de NTG (N-metil N'nitro N'nitroso Guanidina) por 45 min a 30°C. As células foram lavadas repetidas vezes, ressuspensas em água, plaqueadas em meio ágar MRS e cultivadas por 24 h a 30°C.

4.2 Manutenção do Microrganismo

A cepa foi mantida em tubos de ensaio inclinados a 4°C, contendo meio de cultura específico, conforme a composição descrita na Tabela 4.1, previamente esterilizado a 121°C por 15 min. As culturas foram repicadas a cada 20 dias. O pH do meio foi ajustado a 5,5.

Tabela 4.1: Composição do Meio de Manutenção.

Composto	Concentração (g/L)
Sacarose	50,0
Extrato de Levedura	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2
Ágar	20,0

4.3 Preparo do Inóculo

O mutante de *Zymomonas mobilis* foi incubado por 24h a 30°C no meio líquido, de composição idêntica ao do meio descrito na Tabela 4.1, exceto ágar. Desta cultura foi transferida uma alíquota de 10% (v/v) para frascos contendo meio estéril.

4.4 Fermentação em Erlenmeyers

Os ensaios de fermentação foram realizados em erlenmeyers de 500mL, contendo 100 mL do meio descrito na Tabela 4.2, previamente esterilizados a 121°C e conduzidos a 30°C por 16h sob agitação em "shaker" a 100 rpm. Destas fermentações foi obtido o extrato enzimático bruto.

Tabela 4.2: Composição do Meio de Fermentação.

Composto	Concentração (g/L)
Sacarose	180,0
Extrato de Levedura	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0

pH: 5,5

4.5 Seleção do Suporte para Imobilização da Enzima

Foram testados os seguintes suportes: Carvão Ativado, Resina de Troca Catiônica Amberlite 200, Resina de Troca Catiônica Amberlite IRC – 50, Resina de Troca Catiônica Permutation, Resina de Troca Aniônica III, Resina de Troca Aniônica Permutation e Resina de Troca Iônica Purolite.

4.5.1 Teste de Imobilização

O caldo fermentado foi previamente centrifugado para separação de células. A uma amostra (50 mL) de caldo fermentado contendo a enzima levanasacarase foi adicionada uma massa definida de suporte (5 g). Os ensaios foram realizados em um conjunto de Beckers encamisados, mantidos a 4°C sob agitação.

Foram retiradas alíquotas do líquido, nas quais foi determinada a atividade enzimática, conforme descrito no item 4.7.1. Quando o meio apresentou atividade de enzima constante, foi então determinado o tempo necessário para imobilização da enzima. Comparando a atividade de enzima inicial e final do meio obteve-se o percentual de enzimas imobilizadas no suporte.

4.5.2 Eficiência da Imobilização

Para verificar a eficiência da imobilização, o suporte foi filtrado, lavado com água deionizada e transferido a uma solução de sacarose 10% (p/v), mantido sob agitação a 50°C por 1 h. Foram retiradas amostras nas quais foi determinada a atividade enzimática referente a enzima em solução, ou seja, a atividade de enzima retida após a imobilização.

Com o intuito de comprovar os resultados obtidos quanto à atividade de enzima imobilizada realizou-se o seguinte teste: adicionou-se 5 g de suporte a uma solução de 50 mL de sacarose 10% (p/v) sem presença de enzimas, o ensaio foi mantido por 1 h a 50°C sob agitação, determinou-se então a concentração de glicose na solução.

4.6 Experimentos em Coluna

Foram construídos reatores de coluna em vidro pirex, com altura de 20 cm e diâmetro interno de 6 mm, como mostra o esquema representado na Figura 4.1. O reator foi mantido a 50°C através de encamisamento externo.

O suporte com a enzima imobilizada foi transferido para a coluna onde ficou retido através de uma malha de lã de vidro. O suporte foi lavado com água deionizada para retirada do sobrenadante do meio.

Os experimentos foram conduzidos com o reator de coluna operando continuamente (sem reciclo) e em batelada (com reciclo). Quando operado em reciclo, a corrente de saída foi retornada ao Becker da solução (alimentação), obtendo desta maneira o reciclo total da solução eluída.

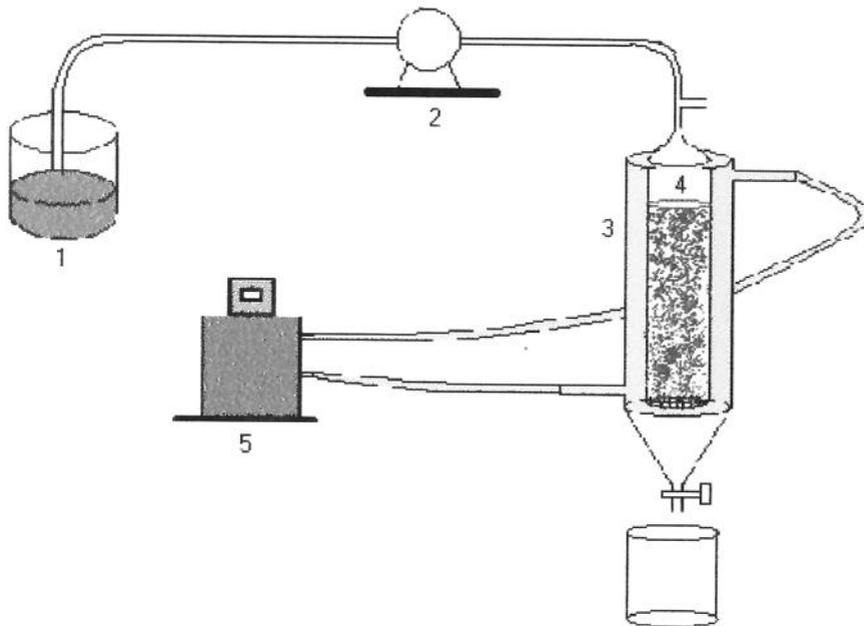


Figura 4.1: Esquema do Reator de Coluna. 1: Solução de açúcar, 2: Bomba peristáltica, 3: Reator de Coluna (com encamisamento externo), 4: Suporte com enzima imobilizada, 5: Banho termostatizado.

Para avaliar a influência da concentração do substrato na formação de frutoligossacarídeos o reator foi alimentado com soluções de sacarose pura variadas de 10 a 50%, quando operado sem reciclo e com soluções de sacarose/frutose nas razões 3:1 e 7:1 operando com reciclo total, conforme observado nas Tabelas 4.3 e 4.4, que indicam as concentrações de açúcares estudadas em cada experimento, sem e com reciclo, respectivamente.

A vazão de alimentação das soluções de açúcares foi variada em limites estabelecidos em função do marcador "dial" da bomba peristáltica (Milan) utilizada para os ensaios em coluna (marcas 10, 20, 30, 40 e 50), sendo que os ensaios com sacarose sem

reciclo foram realizados com vazão constante (marca 30). Para cada uma destas marcas da bomba peristáltica foi determinada a Taxa Mássica (TM) em g/min em função da concentração de sacarose utilizada, ou seja, para cada ensaio realizado foi coletada e pesada uma amostra em tempo definido.

Tabela 4.3: Experimentos realizados sem reciclo e os respectivos percentuais de açúcar utilizados.

Experimento	Concentração de Sacarose (%)
E – I	10
E – II	10
E – III	20
E – IV	20
E – V	20
E – VI	20*
E – VII	30
E – VIII	40
E – IX	40
E – X	50
E – XI	50

* 17,5% de Sacarose e 2,5% de Frutose

Tabela 4.4: Experimentos realizados com reciclo e os respectivos percentuais de açúcar utilizados.

Experimento	Açúcar(%)	Sacarose(%)	Frutose(%)
R – XII	20	17,50	2,50
R – XIII	20	15,00	5,00
R – XIV	30	26,25	3,75
R – XV	40	35,00	5,00

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Determinação da Atividade Enzimática

A 1 mL de solução enzimática foram adicionados 9 mL de solução de sacarose 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5. A reação enzimática foi realizada a 50°C por 1 h, sendo as amostras inativadas por 10 min em banho de água fervente.

A atividade de hidrólise da sacarose foi medida pela concentração de glicose liberada através do método da glicose oxidase/peroxidase (Kit Bio Diagnóstica – Glicose Enz Color).

Uma unidade de atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de glicose/minuto/mL.

4.7.2 Determinação de Açúcares Redutores (AR)

A determinação de AR foi realizada nas amostras retiradas do eluente do reator de coluna pelo método de Somogyi-Nelson (1952).

Para expressar a resposta e determinar a concentração, fez-se uma comparação com a curva padrão para a sacarose hidrolisada (Apêndice A).

4.7.3 Determinação de Glicose

A concentração de glicose nas amostras do eluente do reator foi determinada pelo método da glicose oxidase/peroxidase, conforme item 4.7.1.

4.7.4 Determinação do pH

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro (DIGIMED, modelo DM 20).

4.7.5 Cromatografia em Papel

Os açúcares foram identificados através de cromatografia em papel Whatman nº1, sendo utilizado como padrões sacarose, frutose, glicose. Amostras e padrões foram aplicados com 10% de concentração.

A cromatografia descendente foi desenvolvida utilizando como sistema solvente acetato de etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v) e, revelada com reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico.

4.7.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação dos frutoligossacarídeos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo metodologia de Jung *et al.* (1989), em Cromatógrafo Waters 510, acoplado a um detector refratométrico diferencial Waters 410 e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel foi utilizada água desmineralizada e degaseificada a 80°C sob fluxo de 0,6 mL/min. Foi construída uma curva de calibração com 5 pontos para os padrões sacarose, frutose, glicose, 1-kestose, nistose e frutossilnistose.

4.8 Determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR) e Número de Dispersão (D/ μ L)

O objetivo deste estudo foi determinar o tempo médio de residência (\bar{t}) experimental a fim de correlacioná-lo com a concentração e qualidade dos produtos formados; bem como o ajuste do modelo de dispersão.

A determinação da distribuição do tempo de residência (DTR) foi realizada através do método do estímulo e resposta segundo Levenspiel (1987).

O estímulo utilizado foi o Degrau; que consistiu em substituir a corrente de alimentação (água deionizada) por uma corrente de mesma vazão e concentração (C_0) conhecida de traçador inerte, que pudesse ser facilmente analisado na corrente de saída e que não alterasse as propriedades físicas do fluido. Substituiu-se então a corrente de alimentação por uma de corrente de glicose 5 g/L (C_0). Na saída do reator foi medida a

concentração de glicose $C(t)$ em função do tempo, medida esta que corresponde à resposta do estímulo.

Sabendo que $C(t)/C_0$ representa a fração de fluido com tempo de residência menor que t , logo, a resposta ao degrau na forma adimensional $C(t)/C_0$ corresponde à curva $F(t)$.

Sendo:

$$F(t) = \int_0^t E(t) \cdot dt \quad (4.1)$$

Verifica-se que:

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (4.2)$$

E sabendo que $E(t)$ corresponde à fração instantânea de fluido com tempo de residência t e \bar{t} o valor médio do tempo de residência para todo o fluido; verifica-se então que:

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) \cdot dt \quad (4.3)$$

A determinação da DTR foi realizada no reator de coluna de leito fixo utilizado no estudo em questão, a coluna foi preenchida com 4 g de carvão ativo previamente lavado com água deionizada, apresentando 18,5 cm de altura de leito.

O controle da vazão de escoamento dos ensaios, ocorreu através da bomba peristáltica também utilizada no estudo em questão. Foram realizados três ensaios; DTR 10, DTR 30 e DTR 50 (onde: 10, 30 e 50 correspondem ao “dial” da bomba).

Para cada ensaio, amostras foram retiradas até o instante que a medida da concentração de traçador na corrente de saída ($C(t)$) fosse igual à concentração de traçador na corrente de alimentação (C_0).

O número de dispersão é dado por $D/\mu L$, que é um parâmetro adimensional e mede a qualidade da mistura na coluna. A avaliação deste parâmetro a partir de uma

curva experimental é obtida calculando-se sua variância. A variância representa o quadrado da amplitude da distribuição e tem unidades de tempo (tempo)². Para uma curva contínua ou para medidas discretas dentro de intervalos de tempo iguais, a variância é expressa segundo Equação 4.4.

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 E dt \quad (4.4)$$

Na forma discreta, fica:

$$\sigma^2 = \sum t_i^2 E_i \Delta t - \bar{t}^2 \quad (4.5)$$

Modelos de dispersão de pequena intensidade, são representados através da Equação 4.6, que relaciona a variância com $D/\mu L$.

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} = 2 \frac{D}{\mu L} \quad (4.6)$$

Desta maneira, substituindo (4.5) em (4.6) obtém-se o parâmetro $D/\mu L$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microrganismo

Como descrito no item 3.1 utilizou-se cepa mutante de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 obtida por Wendt (2001) e conservada em laboratório conforme metodologia de manutenção descrita no item 4.2, metodologia esta, também otimizada por Wendt (2001).

No entanto, ao iniciar-se os experimentos, foi verificada certa dificuldade de adaptação do microrganismo, apresentando maior fase lag, tanto no meio de manutenção bem como no de fermentação, ocasionando desta maneira, alterações no resultado do processo fermentativo com conseqüente diminuição da produção da enzima requerida para o estudo, a levanasacarase. Uma das possíveis causas, pode ter sido o encapsulamento do microrganismo pelo polissacarídeo levana. Após sucessivas repicagens em intervalos de tempo pequenos, normalizou-se a adaptação da *Zymomonas mobilis* ao meio de cultura.

5.2 Seleção do Suporte

A Tabela 5.1 e a Figura 5.1 mostram os resultados obtidos durante o processo de imobilização de levanasacarase, onde é possível observar que após 4 horas de imobilização, apenas o carvão ativado e a resina de troca catiônica Permuton apresentaram resultados favoráveis quanto a imobilização da enzima, visto que para os outros suportes testados não foi verificada queda de atividade no meio, não sendo verificado portanto, imobilização da enzima nestes.

Tabela 5.1: Atividade enzimática (UI) e o percentual de enzimas imobilizadas obtidas nos experimentos de seleção do suporte.

Suporte Testado	Atividade de Enzimas (UI)					Imobilização (%)
	t = 0h	t = 1h	t = 2h	t = 3h	t = 4h	
Carvão Ativado	0,841	0,759	0,622	0,543	0,452	46,25
Resina Catiônica Amberlite 200	0,775	0,773	0,761	0,751	0,750	3,23
Resina Catiônica Amberlite IRC-50	0,775	0,770	0,772	0,761	0,762	1,68
Resina Catiônica Permuton	0,841	0,802	0,765	0,711	0,696	17,24
Resina Aniônica III	0,775	0,776	0,771	0,766	0,765	1,29
Resina Aniônica Permuton	0,841	0,833	0,829	0,825	0,820	2,50
Resina Iônica Purolite	0,770	0,761	0,765	0,759	0,755	1,95

Onde: t = 0h corresponde à atividade inicial de enzima do caldo fermentado; e os outros tempos correspondem às amostras retiradas durante o processo de imobilização (caldo fermentado acrescido do suporte).

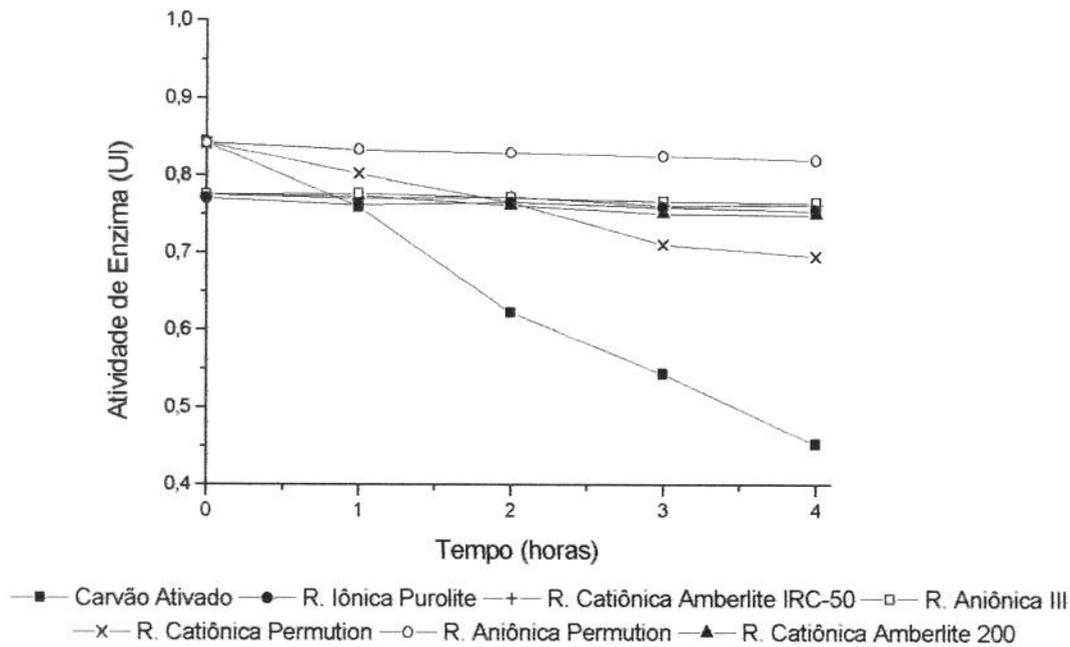


Figura 5.1: Atividade remanescente de enzima (UI) dos meios acrescidos de suporte com o tempo de imobilização (horas).

Quanto à eficiência da imobilização, descrita no item 4.5.2, observa-se na Tabela 5.2 que dos 46,25% de enzima imobilizada no carvão ativado, 51,62% mantiveram sua atividade enquanto, dos 17,24% de enzima imobilizada na resina catiônica Permution, 43,01% mantiveram sua atividade.

Tabela 5.2: Atividade da enzima imobilizada (%)

Suporte	Atividade da Enzima (%)
Carvão Ativado	51,62
Resina Catiônica Permution	43,01

Os ensaios de imobilização foram interrompidos após 4 horas, visto que não foi observado aumento significativo de imobilização em tempos superiores a este, o que foi

verificado pelo fato da atividade do meio de imobilização se manter constante, ficando portanto definido como tempo necessário de imobilização, o tempo de 4 horas.

Jang *et al.* (2000) quando imobilizaram levanasacarase em magnetita titânio ativada, obtiveram 75% de imobilização, o que foi equivalente a 8 UI de enzima por grama de suporte. Neste estudo, a imobilização da levanasacarase ocorreu a 4°C, com pH 4,0, durante 30 min. O autor também verificou que a enzima imobilizada reteve 61% da sua atividade original após 5 usos repetidos.

Os resultados obtidos para a resina catiônica Permuton são referentes a uma aparente atividade hidrolítica do suporte e não de enzima imobilizada, visto que o mesmo hidrolisou sacarose sem a presença de enzima, o que é verificado pela concentração de glicose (g/L) na, conforme citado no item 4.5.2 e apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Concentração de glicose (g/L) para os testes realizados sem adição de enzimas.

Teste Realizado	Glicose (g/L)
Carvão Ativado + Solução Sacarose 10%	0,90
Resina Catiônica Permuton + Solução Sacarose 10%	9,76
Solução Sacarose 10%	0,74

Dentre os suportes testados o carvão ativado apresentou resultados favoráveis a imobilização de levanasacarase, com 46,25% de enzima imobilizada, apresentado 0,1 UI de enzima imobilizada por grama de carvão e mantendo 51,62% destas moléculas ativas. Em função disto, foi o suporte selecionado para os experimentos em coluna com a enzima imobilizada.

O carvão ativado utilizado no estudo encontrava-se na forma granulada, que para ser utilizado como suporte na imobilização foi previamente moído e peneirado em peneiras de análise granulométrica. A massa de carvão utilizada ficou retida entre as malhas 20 e 30 com aberturas de 850 e 600 μm respectivamente, o que permitiu concluir que o diâmetro médio do carvão que serviu de suporte ficou na faixa de 0,60 a 0,85 mm.

O carvão também foi sucessivamente lavado com água deionizada antes do processo de imobilização.

Kovalenko *et al.* (2001) avaliaram partículas de carvão com diâmetros de poro variados, assim como grafite e fuligem de carvão, na imobilização de proteínas. Os autores observaram que carvão com poros de diâmetro médio igual a 0,016 μm parece ser o ótimo para a estabilização de glicoamilase e que a estabilidade da enzima adsorvida diminuiu com o aumento do diâmetro médio do poro do carvão; para enzima imobilizada em fuligem de carvão e grafite a estabilidade diminuiu com o aumento médio do diâmetro do poro, concluindo desta maneira que, para proteínas a estrutura porosa foi de crucial importância na adsorção da enzima pelos suportes de carvão estudados.

O efeito ocasionado pelas diferenças na porosidade de suportes foram avaliadas por Ettalibi e Baratti (2001), quando estudaram a utilização da inulinase imobilizada em vidro poroso, com diâmetro de poro variando de 80 a 3000 Å e área específica de 400 a 10 m^2/g , respectivamente. A quantidade de proteína imobilizada incrementou com a área específica do suporte, aumentando de 10,9 a 35,0 mg e foi máxima para suporte com 80 Å de diâmetro de poro. Este suporte tem área específica elevada (400 m^2/g), o que indicou que o tamanho do poro não foi o fator limitante para a imobilização, mas sim o total da superfície disponível para ligações com a enzima, verificando ainda o aumento da atividade da enzima com a área específica do suporte.

5.3 Experimentos em Coluna

Os dados referentes às medidas de taxa mássica (TM) realizadas para as diferentes concentrações de sacarose, referentes ao “dial” da bomba em que se estava operando, conforme descrito no item 4.6, estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Valores médios das medidas de taxa mássica (TM) em função do “dial” da bomba obtidos durante os experimentos.

% Sacarose	TM (g/min) referente ao “Dial” da Bomba				
	10	20	30	40	50
10	1,28	2,69	3,90	4,92	5,80
20	1,35	3,14	4,67	5,78	7,1
30	1,68	3,44	4,98	6,42	7,74
40	1,92	3,62	5,22	6,60	8,04
50	1,99	3,81	5,67	7,36	8,72

5.3.1 Ensaios com Sacarose sem Reciclo

Quando o reator de coluna (20 x 0,6 cm) foi operado continuamente sem reciclo a 50°C, cada experimento foi alimentado com diferentes concentrações de sacarose (de 10 a 50%), e para cada percentual de sacarose a taxa de escoamento foi variada através do “dial” da bomba de 10 a 50.

Os resultados obtidos na análise da concentração de glicose podem ser observados nas Tabelas 5.5 e 5.6. Verifica-se através dos mesmos que a variação na taxa de escoamento não teve influência na hidrólise da sacarose, visto que a concentração de glicose liberada no meio se manteve praticamente constante para cada percentual de açúcar estudado.

O fato de não ocorrer incrementos ou decréscimos na concentração de glicose, provavelmente aconteceu por ter-se trabalhado com taxas de escoamento superiores

àquelas que permitiriam hidrólise e transfrutossilacção, visto que a variação da taxa de escoamento foi aproximadamente de 6,75 cm³/min quando o “dial” estava na marca 50 para 1,31 cm³/min quando o “dial” marcava 10, indicando altas taxas de escoamento quando comparadas a experimentos realizados por outros autores.

A influência das baixas taxas de escoamento foi observada por Chien *et al.* (2001) quando estudaram a produção de frutoligosacarídeos a partir de *Aspergillus japonicus* imobilizado em glúten. A reacção ocorreu em reator de coluna contínuo (18 x 1,55 cm), empacotado com 8 g do suporte, através do qual foi eluída uma solução de sacarose 40% (p/p) a 37°C. Quando a taxa de escoamento foi reduzida, observou-se um incremento na produtividade, definida como produto da taxa de escoamento pela fração mássica total de frutoligosacarídeos, que foi máxima quando operaram o sistema em 0,8 cm³/min. A fração mássica de frutoligosacarídeos também aumentou de 0,20 para 0,54 p/p quando a taxa de escoamento diminuiu de 1 para 0,1 cm³/min. Com as condições 40% de sacarose e 0,1cm³/min a fração mássica média de frutoligosacarídeos foi mantida constante em 0,53 p/p por 4 dias, sendo reduzida a 0,4 p/p após 18 dias e apresentando redução de 50% em 34 dias.

Ettalibi e Baratti (2001) também observaram influência da taxa de escoamento, quando avaliaram o comportamento da inulinase imobilizada em reator de coluna contínuo (21 x 1,3 cm), empacotado com 9,2 g de enzima imobilizada em vidro poroso e alimentado com soluções de sacarose de 0,3, 1 e 2 M em diferentes taxas de escoamento. Os autores verificaram completa hidrólise da sacarose com 0,3 M a 45°C e taxa de escoamento de 0,11 cm³/min. A estabilidade operacional do reator também foi avaliada pelos autores, sendo a meia-vida do reator estimada em 350 dias quando testado com 2 M, 50°C e 0,05 cm³/min.

Tabela 5.5: Concentração de glicose (g/L) nos ensaios E-I a E-VI realizados sem reciclo.

Ensaio	"Dial"	10% Sac	10% Sac	20% Sac	20% Sac	20% Sac	20% Sac
		E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
1	10	1,90	1,75	2,67	2,87	3,04	1,30
2	20	1,76	1,87	2,81	2,60	2,71	1,30
3	30	1,90	1,91	2,81	2,60	2,49	1,30
4	40	1,85	1,80	2,89	2,66	2,37	1,36
5	50	1,92	1,70	2,83	2,43	2,05	1,48

Tabela 5.6: Concentração de glicose (g/L) nos ensaios E-VII a E-XI realizados sem reciclo.

Ensaio	"Dial"	30% Sac	40% Sac	40% Sac	50% Sac	50% Sac
		E-VII	E-VIII	E-IX	E-X	E-XI
1	10	2,75	3,98	4,68	4,93	6,01
2	20	2,75	4,31	4,22	5,03	6,43
3	30	2,16	4,64	3,77	5,10	6,42
4	40	1,94	4,31	3,27	5,23	6,19
5	50	2,16	4,31	3,57	5,08	6,14

As variações na concentração de glicose observadas de um experimento para outro, quando o reator foi alimentado com o mesmo percentual de açúcar, conforme verificado nas Tabela 5.5 e 5.6, ocorreram possivelmente devido às condições da enzima imobilizada estarem diferentes. Sempre que a coluna com a enzima imobilizada no carvão ativado permanecia sem uso por um período superior a 7 dias, a 4°C, ou após 3 usos consecutivos, realizava-se outra imobilização, podendo então não se tratar da mesma imobilização e em função disto, apresentar diferentes percentuais de enzima imobilizada, ou diferença (perda) de atividade ocasionada pelo reuso.

Os resultados para a análise de açúcares redutores (AR) determinados pela análise colorimétrica de Somogyi-Nelson (1952), estão apresentados no Apêndice B, visto que apresentaram desvios quando comparados com algumas amostras determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que podem ser observados no item 5.3.4, e também pelo fato das determinações realizadas não apresentarem coesão quando comparadas às concentrações dos outros açúcares. Fato ocorrido devido a possíveis interferências na cor ocasionadas por resíduos grafiticos liberados pelo carvão ativado e também em função das altas diluições a que as amostras analisadas foram submetidas. Rodrigues (1999) observou diferenças significativas quando comparou as técnicas analíticas CLAE e Fehling na determinação de açúcares, verificando para esta valores superestimados. Assim como Fehling, Somogyi-Nelson é uma reação de estequiometria desconhecida.

5.3.2 Ensaio com Sacarose e Frutose com Reator Operando em Reciclo

Os experimentos com o reator de coluna operando em reciclo foram realizados no mesmo "dial" da bomba (marca 30). Foram retiradas amostras a cada hora durante 6 horas. Nas amostras coletadas foram determinadas as concentrações de glicose e açúcares redutores conforme metodologia descrita nos itens 4.7.3 e 4.7.2, respectivamente. As curvas obtidas através destas análises podem ser observadas nas Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.

Todos experimentos realizados nas condições de reciclo evidenciam que houve hidrólise da sacarose, o que foi observado pelo aumento da concentração dos açúcares redutores no meio. Este incremento verificado é proporcional para todos os experimentos, exceto no observado na Figura 5.2, que foi realizado a partir de uma solução 20% de açúcar (17,5% de sacarose + 2,5% de frutose), onde foi observada uma maior liberação de glicose no meio. Foram também verificados para todos os experimentos, valores superestimados de açúcares redutores obtidos através da análise de Somogyi-Nelson, visto que os mesmos apresentam valores um pouco superiores aos obtidos por algumas amostras analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme item 5.3.4.

As Figuras 5.2 e 5.3 apresentam resultados obtidos para reações com 20% de açúcar; no entanto, as condições de reação não são idênticas. Na primeira reação a razão

sacarose/ frutose utilizada foi 3:1, com 0,997 UI de atividade de levanasacarase no meio fermentado e com 50% de imobilização de enzimas, enquanto na segunda, a razão sacarose/ frutose foi 7:1 com 0,862 UI de atividade de levanasacarase no meio fermentado e 10% de imobilização.

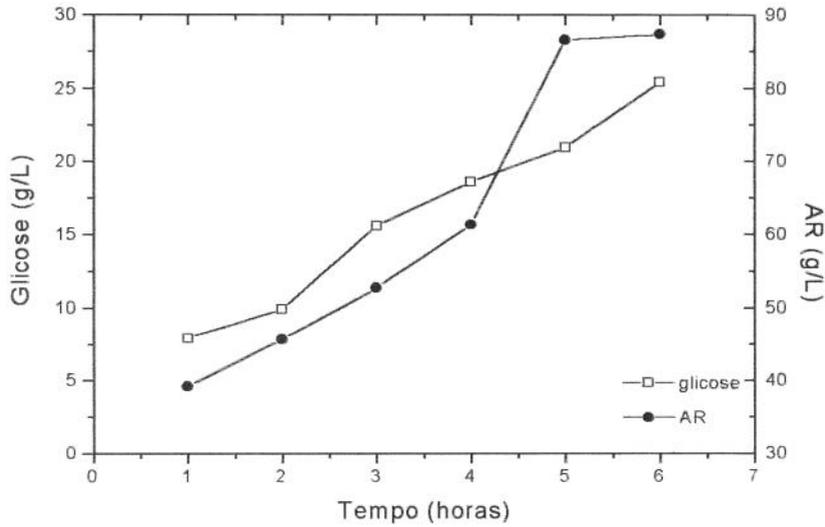


Figura 5.2: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 20% de açúcar [R-XII].

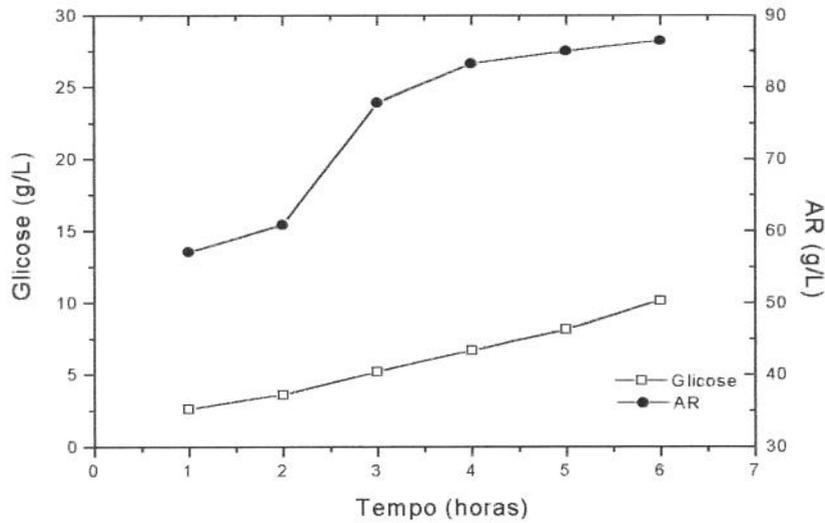


Figura 5.3: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 20% de açúcar [R-XIII].

À medida que a concentração de substrato utilizado passou a ter maiores percentuais, no caso os experimentos com 30 e 40% de açúcar, apresentados nas Figuras 5.4 e 5.5 respectivamente, a hidrólise ocorreu com menor intensidade, fato que pode ter relação com a formação de uma película viscosa e translúcida na superfície do carvão, por onde ocorria a alimentação, indicando pelo aspecto tratar-se possivelmente do polissacarídeo levana. A formação desta película foi verificada na primeira hora de experimento, sendo que nas horas subseqüentes foi observado um sensível aumento de sua espessura. Jang *et al.* (2001) quando imobilizaram levanasacarase em alginato de cálcio observaram que os resultados mostravam um nível significativo de limitação de transferência de massa (efeito entupimento), ocasionado pela produção de levana na superfície do alginato.

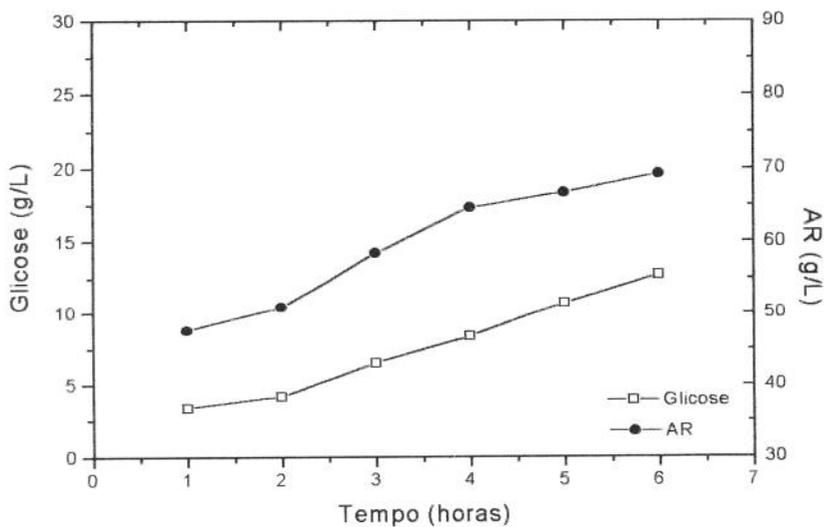


Figura 5.4: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 30% de açúcar [R-XIV].

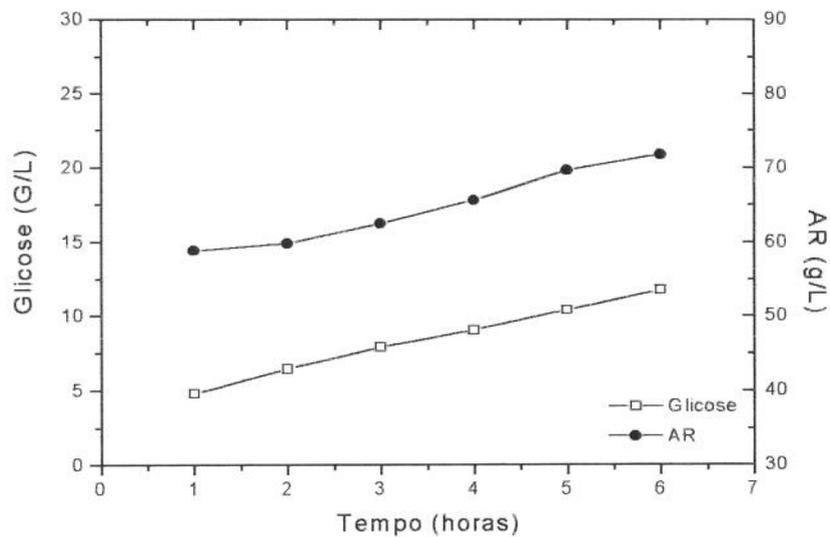


Figura 5.5: Incremento da concentração de glicose (g/L) e açúcares redutores (AR) (g/L) com o tempo de reciclo (horas) no ensaio com 40% de açúcar [R-XV].

5.3.3 Cromatografia em Papel

Os ensaios de cromatografia em papel foram realizados conforme descrito no item 4.7.5, com o objetivo de identificar qualitativamente os experimentos nos quais ocorressem a formação de frutoligossacarídeos, sendo todos os padrões e amostras aplicados a 10%. As Tabelas 5.7 e 5.8 apresentam a relação das amostras do cromatograma 1 mostrado na Figura 5.6 e do cromatograma 2 mostrado na Figura 5.7, respectivamente.

Tabela 5.7: Identificação das amostras apresentadas no cromatograma 1 Figura 5.6.

Amostra	Referência da Amostra
F	Frutose
G	Glicose
S	Sacarose
1	E-IV (10)*
2	E-VIII (50)*
3	R-XII (1)**
4	R-XII (3)**
5	R-XII (6)**
6	R-XIV (1)**
7	R-XIV (3)**
8	R-XIV (6)**

(xx)* refere-se ao “dial” da bomba nos experimentos (E) sem reciclo e (y)** refere-se à hora de reciclo nos experimentos (R) com reciclo.

No cromatograma 1 que pode ser observado na Figura 5.6, verifica-se que as amostras de 1 a 8 apresentaram apenas manchas referentes aos padrões glicose, frutose e sacarose.

Para as amostras 1 e 2 (20 e 40% de sacarose) são observadas manchas mais nítidas para a sacarose em relação aos outros padrões, o que indica que praticamente não houve hidrólise. Já as amostras 3 a 8, continham sacarose e frutose livre no meio, o que foi evidenciado pelas manchas destes padrões, sendo ainda verificado que houve hidrólise, através da presença do padrão glicose, exceto nas amostras 3 e 6 que correspondem a 1 hora de reciclo.

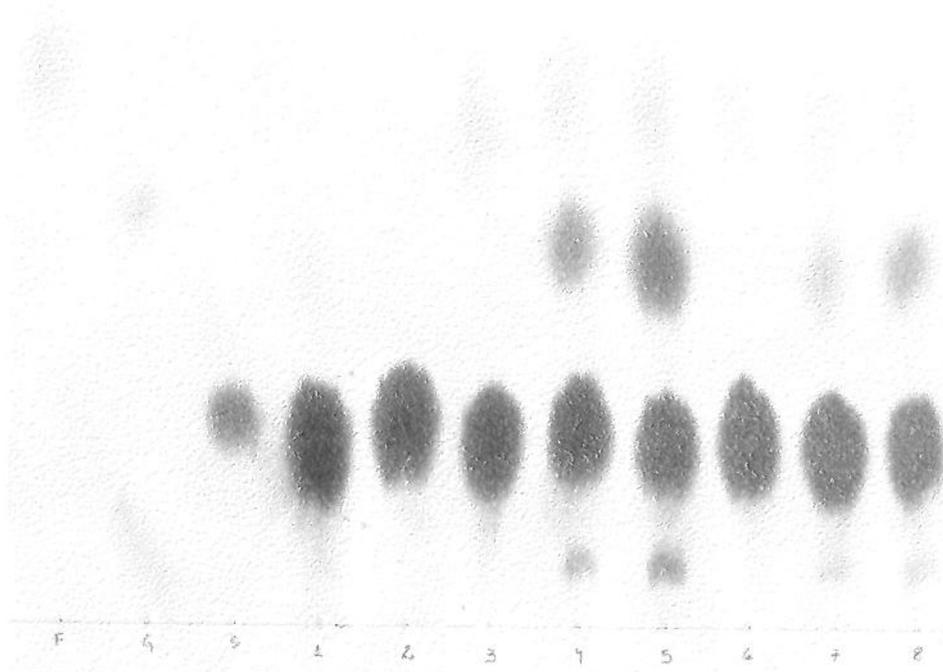


Figura 5.6: Cromatograma 1, onde são observados da esquerda para direita os padrões F,G e S e as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5.8: Identificação das amostras apresentadas no cromatograma 2 Figura 5.7.

Amostra	Referência da Amostra
F	Frutose
G	Glicose
S	Sacarose
1	E-VIII (30)*
2	E-IV (30)*
3	E-IV (50)*
4	E-VI (10)*
5	E-VI (30)*
6	E-VI (50)*

(xx)* refere-se ao "dial" da bomba nos experimentos (E) sem reciclo

Na Figura 5.7 que apresenta o cromatograma 2, observa-se para as amostras 1 a 3 pouca ou nenhuma hidrólise da sacarose, visto que só o padrão referente a este açúcar foi observado. Quanto às amostras 4 a 6, foram verificadas manchas de cor e aspecto semelhante à frutose, nota-se no entanto que estão localizadas em alturas inferiores à da frutose. A medida da base até o centro da mancha foi de 13,8 cm para o padrão frutose e 13,1, 12,8 e 12,6 cm para as amostras 4, 5 e 6, respectivamente, porém esta mesma defasagem foi observada para sacarose, onde a medida da base até o centro da mancha foi de 5,3 cm para o padrão sacarose e 4,7, 4,6 e 4,5 cm para as amostras 4, 5 e 6, respectivamente. Desta forma, é possível afirmar que as manchas observadas não se tratam de possíveis frutoligossacarídeos mas sim, que foram ocasionadas em virtude de uma inclinação do papel no momento da corrida cromatográfica.

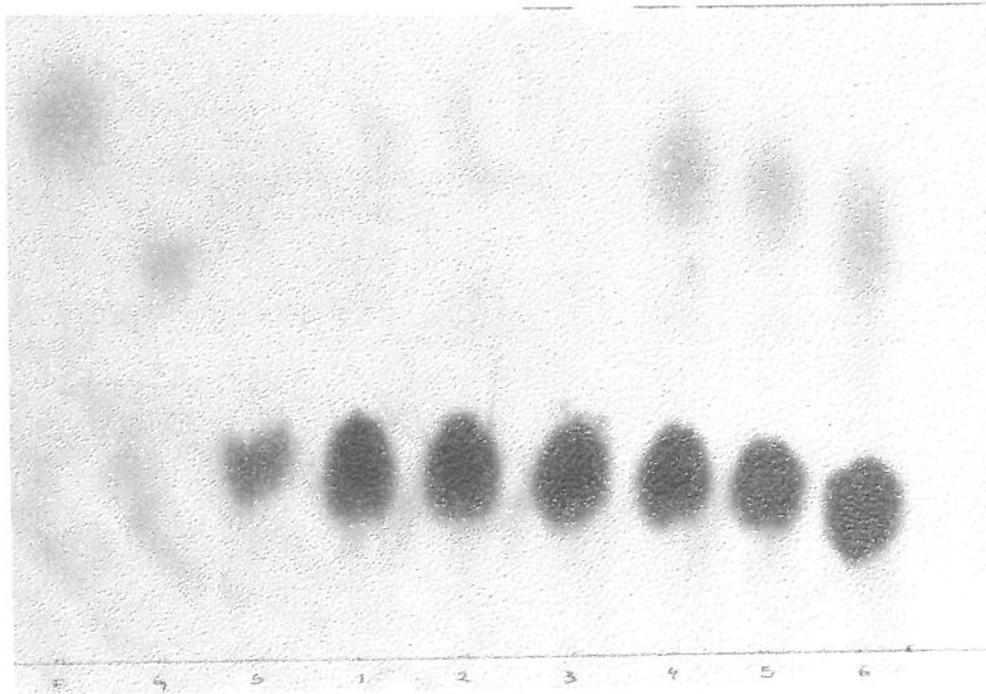


Figura 5.7: Cromatograma 2 onde são observados da esquerda para direita os padrões F, G e S e as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Além das amostras observadas nos cromatogramas 1 e 2, foram feitas cromatografias de 32 amostras, perfazendo mais 5 cromatogramas, abrangendo desta maneira todos os experimentos realizados. Todos os cromatogramas apresentaram

comportamento semelhante ao observado na Figura 5.6, cromatograma 1, visto que, as amostras evidenciaram manchas para frutose apenas quando esta foi previamente adicionada ao meio, sem apresentar manchas intermediárias que pudessem representar outros açúcares.

5.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise dos açúcares realizada por CLAE utilizou como eluente água desmineralizada e degaseificada a 80°C com fluxo de 0,6 mL/min. Como padrões foram utilizados sacarose, frutose, glicose, 1-kestose, nistose, e frutossilnistose.

A concentração de sacarose, frutose e glicose presentes nas amostras coletadas durante os experimentos estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Concentrações (p/v) de sacarose, frutose e glicose obtidos através da CLAE.

Amostra	Ensaio	% Sacarose	% Frutose	%Glicose
A	E-VIII (20)*	18,2 ± 0,1	nd	nd
B	R-XIV (4)**	21,3 ± 0,4	4,90 ± 0,24	1,06 ± 0,16
C	E-XI (30)*	35,9 ± 0,4	nd	nd
D	E-VII (40)*	20,8 ± 0,3	nd	nd
E	E-VII (30)*	11,1 ± 0,5	4,13 ± 0,27	nd
F	E-VII (50)*	9,68 ± 0,44	3,57 ± 0,52	nd
G	R-XV (3)**	25,4 ± 0,3	4,38 ± 0,06	nd
H	R-XII (5)**	14,8 ± 0,1	7,10 ± 0,34	2,88 ± 0,08
I	E-IX (30)*	29,4 ± 0,3	nd	nd
J	E-IV (30)*	27,2 ± 0,3	nd	nd

(xx)* refere-se ao "dial" da bomba nos experimentos (E) sem reciclo, (y)** refere-se à horas de reciclo nos experimentos (R) com reciclo e nd corresponde a não detectado.

Verifica-se que as concentrações de açúcares por CLAE variam um pouco daquelas obtidas pelo kit enzimático Enz Color, assim como pelo método colorimétrico Somogyi-Nelson, fato provavelmente influenciado pelas altas concentrações do dissacarídeo e baixas concentrações dos monossacarídeos, indicando pouca hidrólise, conforme observado nos cromatogramas (Apêndice D); além das observações comentadas no item 5.3.1. Além disso, as amostras foram submetidas a diluições 1/50 para detectar a sacarose, deste modo, todos os açúcares presentes na amostra foram diluídos, o que pode ter ocasionado o desaparecimento dos picos daqueles presentes em concentrações muito baixas, como por exemplo o fato de não ter sido detectada a glicose nos experimentos sem reciclo, visto que esta foi determinada através do kit enzimático e variou de 1 a 6 g/L. O que pode, da mesma maneira, ter influenciado a determinação dos frutoligossacarídeos.

Os padrões dos frutoligossacarídeos apresentaram tempos de retenção bastante próximos: 7,0 min para nistose, 7,5 min para 1-kestose e 6,9 min para frutossilnístose. A curva de calibração realizada registrou apenas dois sinais, um em 7,0 min e outro em 7,5 min, ocorrendo provavelmente sobreposição da nistose com a frutossilnístose. Através dos cromatogramas (Apêndice D) verifica-se que as amostras B, G e H apresentaram picos em 7,6 min. Considerando a proximidade com o padrão 1-kestose, estimou-se a concentração deste nas amostras através da correlação com o padrão. A Tabela 5.10 mostra as concentrações de 1-kestose para as amostras B, G e H, visto que apenas estas amostras apresentaram presença do frutoligossacarídeo.

Tabela 5.10: Concentrações (p/v) estimadas de 1-kestose.

Amostra	Ensaio	% 1-kestose
B	R-XIV (4)*	0,28
G	R-XV (3)*	0,13
H	R-XII (5)*	0,42

(x)* refere-se à horas de reciclo nos experimentos (R) com reciclo.

Como observado na Tabela 5.10, a presença de 1-kestose foi detectada apenas nos experimentos que foram realizados com reciclo e adição de frutose no substrato da

reação, o que de certa forma confirma a observação feita no item 5.3.1, que provavelmente a variação da taxa de escoamento utilizada nos experimentos sem reciclo foi superior àquela que permitiria transfrutossilacção, não apresentando desta forma influência nas respostas e não permitindo a observação da influência da variação da concentração de sacarose.

Para os experimentos com reciclo e adição de frutose ao meio, foi observado 0,28% de 1-kestose para a amostra B, com 4 horas de reciclo e 30% de açúcar (26,25% de sacarose e 3,75% de frutose); 0,13% de 1-kestose para amostra G, com 3 horas de reciclo e 40% de açúcar (26,25% de sacarose e 3,75% de frutose) e 0,42% de 1-kestose para amostra H, com 5 horas de reciclo e 20% de açúcar (17,5% de sacarose e 2,5% de frutose).

Apesar da levansacarase catalisar principalmente ligações β -(2 \rightarrow 6), a presença de frutoligossacarídeos com tempos de retenção iguais a 1-kestose, frutoligossacarídeo com ligações β -(2 \rightarrow 1), também foi observada por Euzenat *et al.* (1997) e Crittenden e Doelle (1993) quando estudaram a formação de frutoligossacarídeos a partir de sacarose com levansacarase de *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*, respectivamente.

Euzenat *et al.* (1997) citam como hipótese para a identificação da formação de 1-kestose, o fato da levansacarase catalisar a formação de 1-kestose como um produto secundário da reação, que no entanto, não pode ser usado pela enzima como um acceptor de resíduos frutossil, conduzindo desta forma ao acúmulo de 1-kestose no meio, enquanto que 6-kestose, o trissacarídeo produzido em maior quantidade pela levansacarase, é rapidamente utilizado na formação de levana. A formação de levana nestes experimentos não foi quantificada, porém foi visivelmente observada como descrito no item 5.3.2.

5.4 Determinação da Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

No estudo da determinação da distribuição do tempo de residência (DTR) foram realizados três experimentos, onde se variou a vazão de escoamento através do “dial” da bomba peristáltica (marcas 10, 30 e 50), denominados DTR 10, DTR 30 e DTR 50, respectivamente, conforme apresentado no item 4.10. A concentração de glicose medida ao longo dos ensaios pode ser observada na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Concentração de glicose (g/L) ao longo dos ensaios de DTR .

DTR 10		DTR 30		DTR 50	
Tempo (min)	Glicose (g/L)	Tempo (min)	Glicose (g/L)	Tempo (min)	Glicose (g/L)
0,0	0,00	0,0	0,62	0,0	1,14
2,0	0,00	1,5	1,23	1,5	1,91
4,0	0,50	3,0	1,56	3,0	2,54
6,0	0,71	4,5	1,98	4,5	3,27
8,0	1,00	6,0	2,86	6,0	3,75
10,0	1,36	7,5	3,57	7,5	4,26
12,0	1,57	9,0	3,83	9,0	4,60
14,0	2,36	10,5	3,73	10,5	4,74
16,0	3,25	12,0	4,12	12,0	4,67
18,0	2,89	13,5	4,35	13,5	4,82
20,0	3,79	15,0	4,25	15,0	4,93
22,0	3,64	16,5	4,45	16,5	5,04
24,0	4,18	18,0	4,94		
26,0	4,75	19,5	4,90		
28,0	4,93	21,0	4,97		
30,0	5,00	22,5	5,00		

As medidas experimentais da concentração de glicose obtidas para os ensaios de DTR realizados, observados na Tabela 5.11, mostram que os intervalos de tempo entre os pontos de amostragem (Δt) variam de um ensaio para outro em função da vazão de escoamento de traçador.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10, é possível visualizar as curvas $F(t)$ para DTR 10, 30 e 50, que representam as curvas normalizadas da concentração de glicose obtidas neste experimento através da adimensionalização da concentração ($C(t)/C_0$). Observa-se que as mesmas apresentam comportamento típico da curva F como resposta a um estímulo em degrau. Nota-se que para os ensaios de DTR 30 e 50, as curvas de concentração de traçador não partem do zero, fato ocorrido em função de ter-se utilizado o mesmo recheio de coluna que, mesmo sendo lavado por 2 horas com água deionizada entre um ensaio e outro, apresentou um mínimo de concentração de traçador nos tempos iniciais.

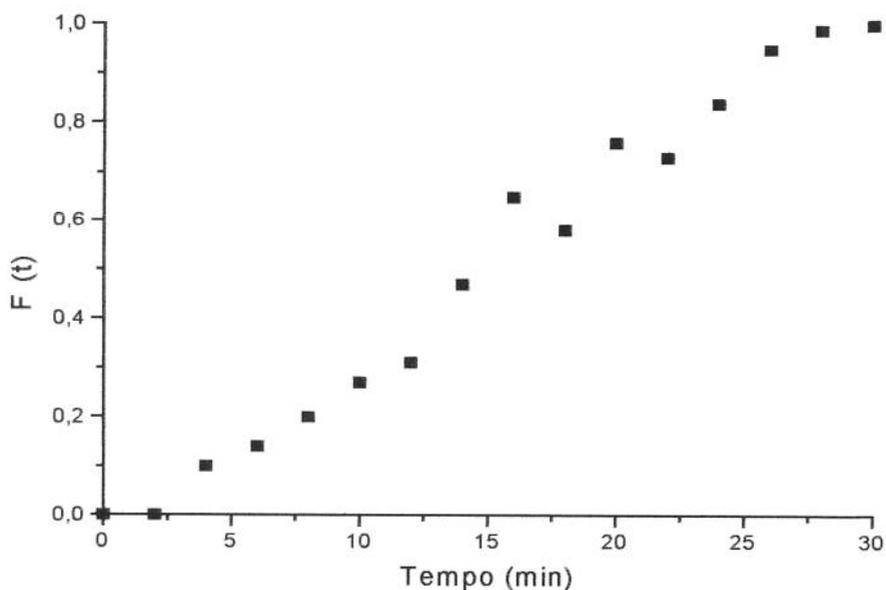


Figura 5.8: Curva $F(t)$ versus tempo (min) para o ensaio de DTR 10.

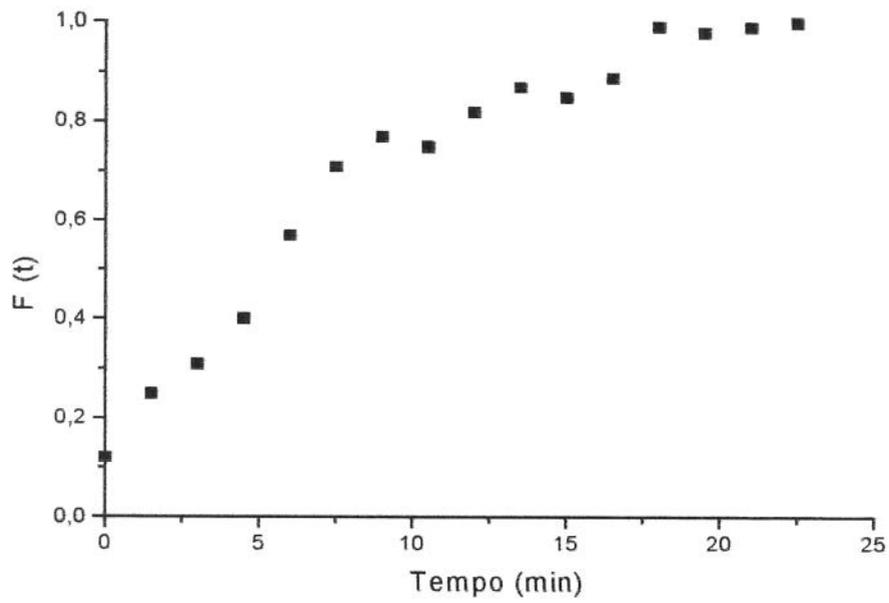


Figura 5.9: Curva $F(t)$ versus tempo (min) para o ensaio de DTR 30.

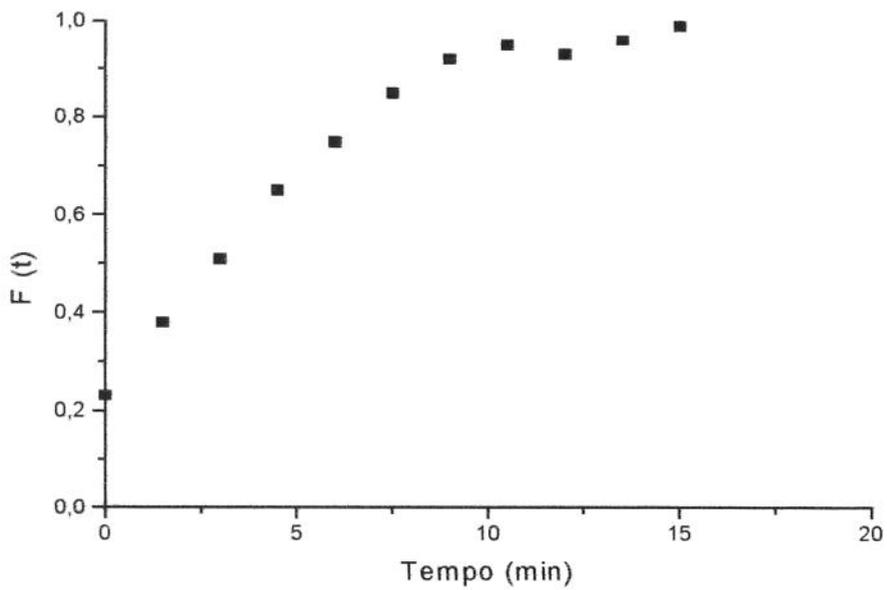


Figura 5.10: Curva $F(t)$ versus tempo (min) para o ensaio de DTR 50.

Através dos dados apresentados e fazendo uso das equações 4.3, 4.5 e 4.6 descritas no item 4.8, foi possível obter para cada vazão trabalhada no estudo da DTR, o tempo médio de residência (\bar{t}) e o número de dispersão ($D/\mu\text{L}$), respectivamente, conforme apresentado na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Tempo médio de residência (\bar{t}) e número de dispersão ($D/\mu\text{L}$) obtidos para determinação da DTR.

DTR	Vazão (cm^3/min)	\bar{t} (min)	$D/\mu\text{L}$
10	1,31	16,03	0,10
30	4,82	6,91	0,08
50	6,75	4,31	0,15

O estudo da dispersão realizado em coluna de leito fixo se ajusta ao modelo de pequena intensidade de dispersão visto que, além do mesmo apresentar escoamento extremamente laminar com número de Reynolds (Re) variando de 4 a 23 (coluna vazia), não foi observada nenhuma alteração significativa na forma da curva de traçador (solução de glicose), permitindo desta forma, caracterizar o reator.

Obteve-se também, o tempo de retenção hidráulico (t_h), que foi calculado através da razão entre o volume de coluna empacotado (V) pela vazão de escoamento do fluido (Q).

Considerando os seguintes dados para o sistema:

- Diâmetro interno (ϕ_i) = 0,6 cm
- Altura do leito na coluna (H) = 18,5 cm
- Vazão do traçador (Q) = 1,31; 4,82 e 6,75 cm^3/min para DTR 10; 30 e 50 respectivamente.

E sabendo que, para reatores tubulares ideais o tempo de retenção hidráulico (t_h) é igual ao tempo médio de residência (\bar{t}), a comparação através dos resultados apresentados na Tabela 5.13, mostrou que t_h foi de 4 a 6 vezes maior que \bar{t} .

Tabela 5.13: Valores obtidos para o cálculo do tempo de retenção hidráulico (t_h) e do tempo médio de residência (\bar{t}).

DTR	t_h (min)	\bar{t} (min)
10	3,99	16,03
30	1,08	6,91
50	0,77	4,31

A determinação da distribuição dos tempos de residência de um fluido em determinado reator, possibilita estimar quando o reator operando em sistema contínuo entrou em estacionário, visto que, este estágio é atingido após três tempos médios de residência. Desta forma, o estudo em questão, permitiu estimar o tempo de tomada das amostras nos ensaios realizados sem reciclo.

Nos experimentos nos quais foi verificada a síntese de frutoligossacarídeos (amostras B, G e H) a bomba que alimentava a coluna operou sempre na mesma posição ("dial" 30). Assim, para as três soluções em questão, a vazão volumétrica de alimentação da coluna foi a mesma, ou seja, cerca de $4,9 \text{ cm}^3/\text{min}$, que corresponde aproximadamente a número de dispersão ($D/\mu\text{L}$) de 0,08 e tempo médio de residência (\bar{t}) de 6,9 min. Contudo, pela Tabela 5.10, observa-se que, para estes experimentos o tempo de reciclo de cada amostra é diferente e quanto maior o tempo de reciclo, maior a síntese de 1-kestose.

6 CONCLUSÕES

1- Dentre os suportes testados, o que apresentou maior capacidade de imobilização foi o carvão ativado, apresentando 0,1 UI de levanasacarase, imobilizada por grama de carvão.

2- Foi observado que a enzima reteve cerca de 50% de sua atividade após a imobilização no carvão ativado.

3- Frutoligosacarídeos foram sintetizados quando o reator de coluna foi alimentado com solução de sacarose e frutose e operava em reciclo.

4- Quando o reator foi operado em reciclo, foi observada a formação de precipitado viscoso e translúcido sobre o carvão, indicando que houve síntese de levana.

5- Não foi verificada síntese de frutoligosacarídeos nos experimentos sem reciclo em função das altas taxas de escoamento utilizadas.

6- A determinação da distribuição do tempo de residência permitiu caracterizar o reator utilizado no estudo. Foram observados tempos médios de residência variando de 4,31 a 16,03 min com número de dispersão variando de 0,08 a 0,15 quando a vazão de escoamento variou de 1,31 a 6,75 cm³/min, respectivamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levam-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 979-986, 2001.
- BELGHITH, H.; SONG, K. B.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Optimal conditions for levam formation by overexpressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 4, p. 467-472, 1996.
- BERNATH, 1986. In: REGULY, J. C. **Biocnologia dos Processos Fermentativos: Produção de enzimas e Engenharia das fermentações**. Pelotas: Editora Universitária, 2000. v. 3. 218p.
- CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo, Livraria Varela, 1996. 423 p.
- CARRANO, C. H. **Probióticos e prebióticos**. 2002. Disponível em <http://www.enteral.com.br/dicas8.htm>. Acesso em: 4 jan. 2003.
- CHAMBERT R.; GONZY-TRÉBOUL G. Levansucrase of *Bacillus subtilis* : kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. **European Journal Biochemical**, v. 62, p. 55-64, 1976.
- CHANG, C.T.; LIN, Y.Y.; TANG, M.S.; LIN, C.F. Purification and properties of fructosiltransferase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 32, p. 269-277, 1994.
- CHEETHAM, P. S. J.; HACKING, A. J.; VLITOS, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. **Enzyme Microbiol technology**, v. 11, n.4, p. 212-219, 1989.
- CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 252-257, 2001.
- COTE, G. L. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 12, p. 879-882, 1988.

- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 302-308, 1994.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 15, n.10, p. 1055-1060, 1993.
- CRUZ, R.; CRUZ, V. D.; BELINI, M. Z.; BELOTE, J. G.; VIEIRA, C. R. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 139-143, 1998.
- DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Methods in Enzymology**, v. 8, p.500-505, 1966.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 596-601,2001.
- EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v. 32, n.3, p.237-243, 1997.
- FOGARTY, W.M.; KELLY, C. T. **Microbial Enzymes and Biotechnology**. 2.ed. London: Elsevier Applied Science, 1990. 472p.
- FORTIFACTS – Notícias sobre Nutrientes. 2002 Disponível em: http://www.fortitech.com/news/02_mar_port.pdf. Acesso em: 4 jan. 2003.
- FUJITA,K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Chemical Structures of Hetero-oligosaccharides Produced by *Arthobacter sp* K-1 β -fructofuranosidase. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 58, n.2, p.239-243, 1994.
- GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 4, p. 412-420, 1994.
- GTC Nutrition-Special Ingredients. 2002. Disponível em: <http://www.gtcnutrition.com/Portuguese/si.html>. Acesso em: 4 jan. 2003.
- HAYASHI, S.; KINOSHITA, J.; NONOGUSHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Continuous production of 1-kestose β -fructofuranosidase immobilized on "shirasu" porous glass. **Biotechnology Letters**, v. 13, n.6, p. 395-398, 1991.

- HESTRIN, S.; FINGOLD, D.S.; AVIGAD, G. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. **Biochemical Journal**, v. 64, p. 340-351, 1956.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A Fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agricultural Biological Chemical**, v. 52, n. 5, p. 1181-1187, 1988.
- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agricultural Biological Chemical**, v. 53, n.3, p. 667-673, 1989.
- IIZUKA, M.; YAMAGUCHI, H.; ONO, S.; MINAMIURA, N. Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 57, n.2, p. 322-324, 1993.
- JANG, K. H.; SONG, K. B.; PARK, B. S.; KIM, C.H.; CHUNG, B.H.; CHOUE, R. W.; LEE, K. S.; LEE, C.; CHUN, U. H.; RHEE, S. K. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 339-343, 2001.
- JANG, K. H.; SONG, K. B.; KIM, J. H.; KIM, C.H.; CHUNG, B.H.; RHEE, S. K. Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxapatite. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 1, p. 89-93, 2000.
- JUNG, K. H.; YUN, J. W.; KANG, K. R.; LIM, J.Y.; LEE, J. H. Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose. **Enzyme Microbial Technology**, v. 11, n.8, p. 491-494, 1989.
- KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n.7, p.661-664, 1997.
- KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 179-184, 1998.
- KEYES, 1984. In: REGULI, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos: Produção de enzimas e Engenharia das fermentações**. Pelotas: Editora Universitária, 2000. v. 3. 218p.

- KIM, M. G.; KIM, C. H.; JONG, S. L.; SONG, K. B.; RHEE, S. K. Synthesis of methyl β -D-fructoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p. 646-651, 2000.
- KOJIMA, I.; SAITO, T.; IIZUKA, M.; MINAMIURA, N.; ONO, S. Characterisation of levan produced by *Serratia sp.* **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 9-12, 1993.
- KOVALENKO, G. A.; KUZNESTSOVA, E. V.; MOGILNYKH, Y. I.; ANDREEVA, I. S.; KUVSHINOV, D. G.; RUDINA, N. A. Catalytic filamentous carbon for immobilization of biologically active substances and non – growing bacterial cells. **Carbon**, v. 39, p. 1033-1043, 2001.
- LEE, W. C.; HUANG, C. T. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 217-227, 2000.
- LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas: Cálculo de Reatores**. 3 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1987. v. 2. 481p.
- MESSING, R.A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. New York: Academic Press, 1975. 232p.
- MODLER, H. W. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.
- MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 187-192, 1995.
- NESTLÉ Clínica. 2002. Disponível em : <http://www.nestle.com.br/nutricaoclinica/fibrasnutricaoenteral/> . Acesso em 4 jan. 2003.
- OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a new sweetener “neosugar” in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1574-1581, 1984.
- OLIVEIRA, I. M. de A. **Produção e caracterização da β -Frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. 1997. 124p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

- PARK, Y. K.; MORTATTI, M. P. L.; SATO, H. H. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 8, p. 515-518, 1983.
- PREZIOSI, L.; MICHEL, G. P. F.; BARATTI, J. Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrase and levansucrase activities. **Canadian Journal Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 159-163, 1989.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**: Produção de enzimas e Engenharia das fermentações. Pelotas: Editora Universitária, 2000. v. 3. 218p.
- RODRIGUES, S. P. **Foods Ingredients**, 2002. Disponível em: <http://www.reistafi.com.br/Main/ed-20/materiais/revisao.htm>. Acesso em 4 jan. 2003.
- RODRIGUES, R. A. F. **Avaliação de técnicas analíticas no monitoramento rendimento da fermentação alcoólica**. 1999. 109p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- ROY, G. **Activated carbon applications in the food and pharmaceutical industries**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995. 193p.
- SANGILYANDI G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from a recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 33, p. 153-156, 1998.
- SANTOS, A. P. M. **Síntese de Oligossacarídeos por Inulinasa de *Kluyveromyces bulgaricus***. 1998. 98p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p.19, 1952.
- SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V. H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredient. **Food Technology**, v. 48, n. 1, p.85-89, 1994.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* : a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301-307, 1996.

- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Bacteriological Review**, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.
- van BALKEN, J. A. M.; van DOOREN, J. G. M.; van DEN TWEEL, W. J. J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E. M. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F-fructosyltransferase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 216-221, 1991.
- VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 252-255, 1984.
- WANG, X. D.; RAKSHIT, S. K. Iso – oligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 771-775, 2000.
- WENDT, R. **Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis***. 2001. 76p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2.ed. New York: Ellis Horwood Limited, 1985. 457p.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.
- YUN, J. W.; JUNG, K. H.; OKU, J. W.; LEE, M. G. Semi-batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 24/25, p. 299-308, 1990.
- YUN, J. W.; LEE, M. G.; SONG, S. K. Batch production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructofuranosidase and glucose oxidase. **Journal of Fermentation and Biotechnology**, v. 77, p. 159-163, 1994.
- ZABORSKY, O. R. **Immobilized Enzymes**. Cleveland: CRC Press, 1973. 175p.

APÊNDICE

APÊNDICE A

A. Curva Padrão para Análise de Açúcares Redutores (AR)

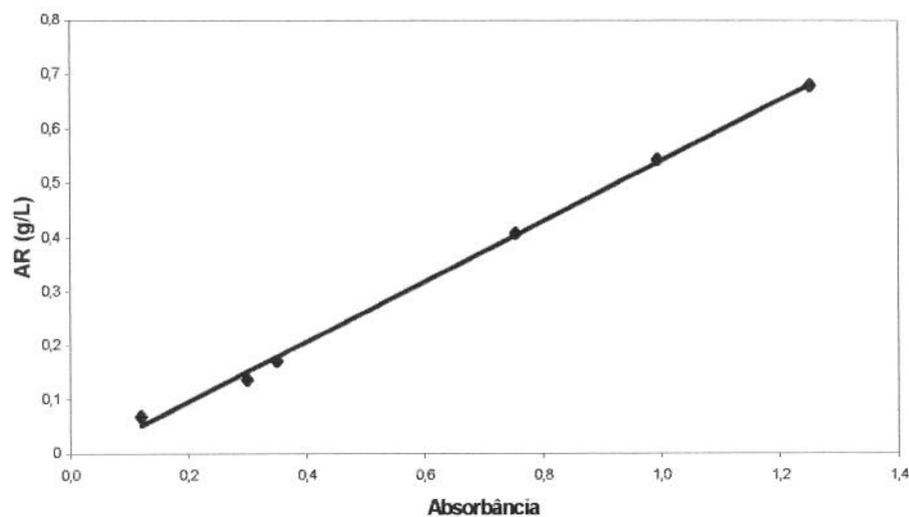


Figura A. 1: Concentração de Açúcares Redutores (g/L) *versus* Absorbância (540 nm).

A equação de reta obtida na Figura A.1, $y = 5298x - 0,0079$ onde y e x referem-se à concentração de sacarose e absorbância a 540 nm respectivamente, possui coeficiente de correlação (R^2) de 0,998.

APÊNDICE B

B. Concentração de Açúcares Redutores (g/L) nos ensaios E-I a E-XI realizados sem reciclo.

Tabela B.1: Concentração de açúcares redutores (g/L) nos ensaios E-I a E-VI realizados sem reciclo.

Ensaio	"Dial"	10% Sac	10% Sac	20% Sac	20% Sac	20% Sac	20% Sac
		E-I	E-II	E-III	E-IV	E-V	E-VI
1	10	2,73	1,77	3,93	1,17	0,57	50,66
2	20	2,55	2,01	3,82	1,22	0,56	66,23
3	30	3,72	2,92	3,79	1,12	0,53	62,74
4	40	3,29	1,24	3,59	1,31	0,41	59,24
5	50	3,31	1,20	3,61	1,06	0,50	57,33

Tabela B.2: Concentração de açúcares redutores (g/L) nos ensaios E-VII a E-XI realizados sem reciclo.

Ensaio	"Dial"	30% Sac	40% Sac	40% Sac	50% Sac	50% Sac
		E-VII	E-VIII	E-IX	E-X	E-XI
1	10	0,87	1,27	1,29	1,16	2,88
2	20	0,86	1,07	1,16	0,59	1,21
3	30	0,83	1,11	0,84	0,61	0,83
4	40	0,83	1,29	0,83	0,36	0,80
5	50	0,86	1,20	0,82	0,51	0,79

APÊNDICE C

C. Concentração de Glicose e Açúcares Redutores (AR) para dos ensaios com reciclo

Tabela C.1: Concentração de glicose e açúcares redutores (AR) no ensaio com 20% de açúcar [R-XII].

Tempo de Reciclo (h)	Glicose (g/L)	AR (g/L)
1	7,90	39,21
2	9,91	45,68
3	15,58	52,67
4	18,58	61,36
5	20,94	86,58
6	25,40	87,32

Tabela C.2: Concentração de glicose e açúcares redutores (AR) no ensaio com 20% de açúcar [R-XIII].

Tempo de Reciclo (h)	Glicose (g/L)	AR (g/L)
1	2,60	57,04
2	3,60	60,83
3	5,20	77,78
4	6,67	83,29
5	8,13	85,04
6	10,13	86,47

Tabela C.3: Concentração (g/L) de glicose e açúcares redutores (AR) no ensaio com 30% de açúcar [R-XIV].

Tempo de Reciclo (h)	Glicose (g/L)	AR (g/L)
1	3,36	47,53
2	4,16	50,82
3	6,53	58,39
4	8,35	64,65
5	10,72	66,66
6	12,72	69,20

Tabela C.4: Concentração (g/L) de glicose e açúcares redutores (AR) no ensaio com 40% de açúcar [R-X].

Tempo de Reciclo (h)	Glicose (g/L)	AR (g/L)
1	4,78	58,76
2	6,42	59,77
3	7,89	62,42
4	9,01	65,60
5	10,36	69,64
6	11,75	71,74

APÊNDICE D

D. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das amostras relacionadas e identificadas na Tabela 5.9

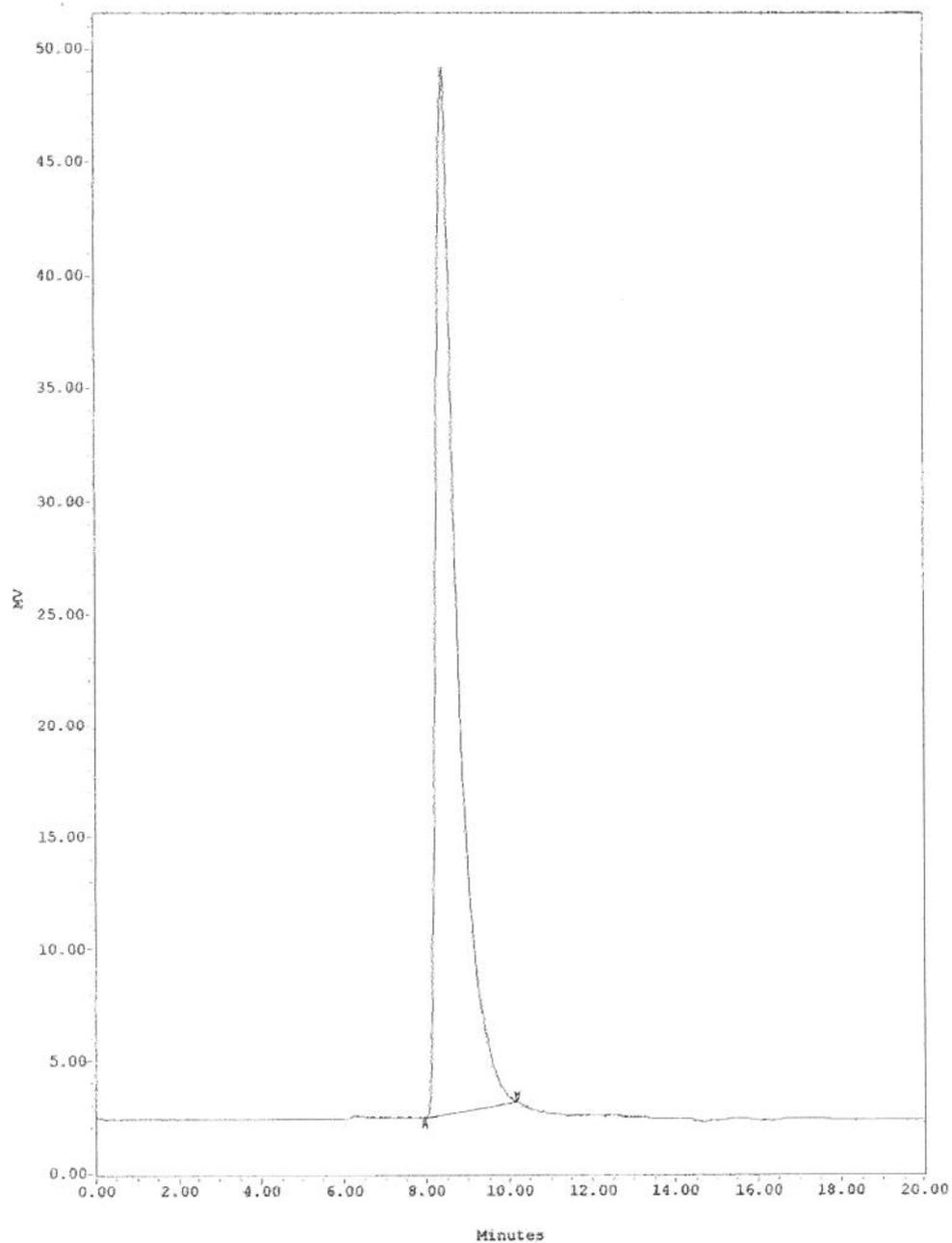


Figura D.1: Cromatograma da amostra A

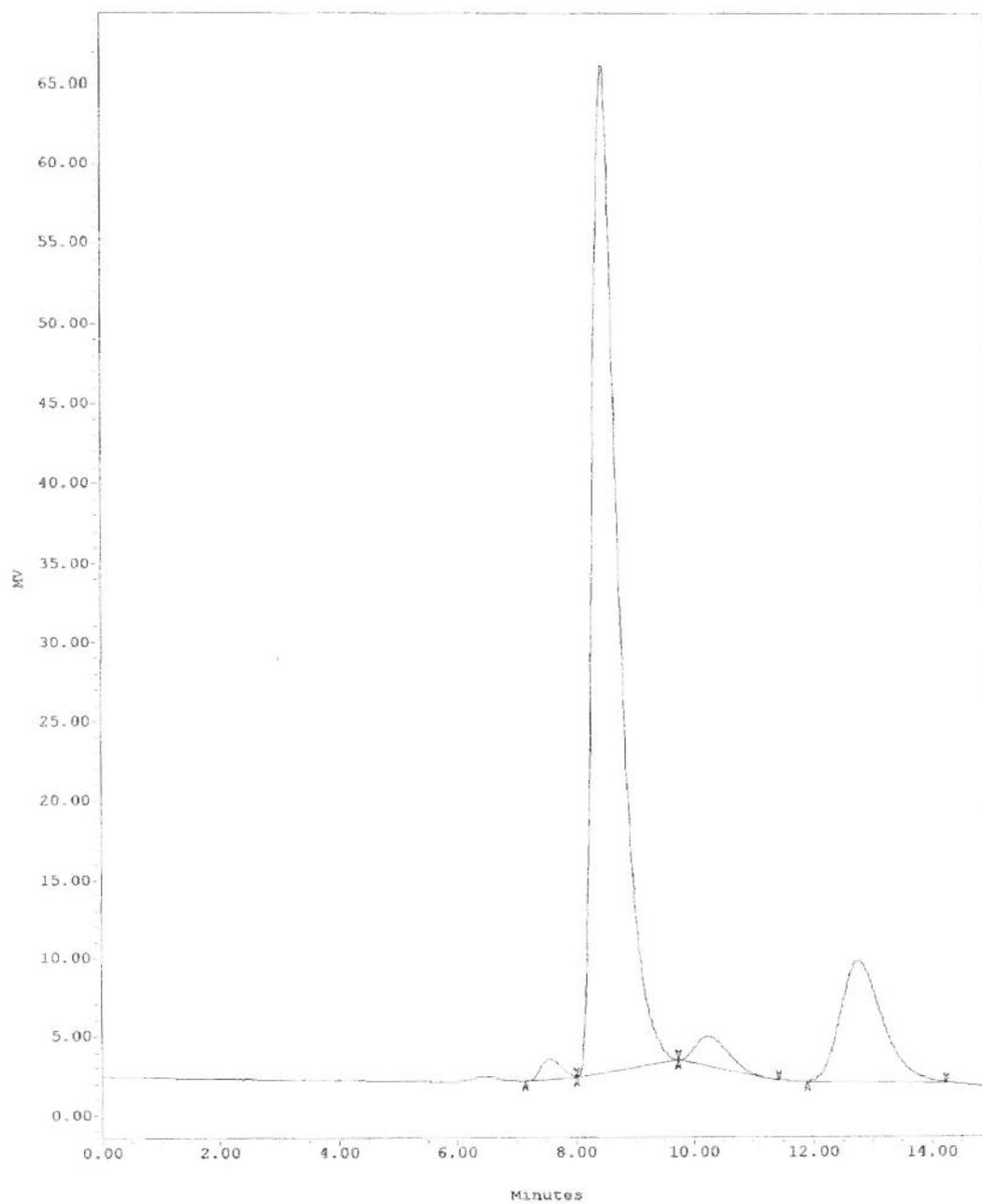


Figura D.2: Cromatograma da amostra B.

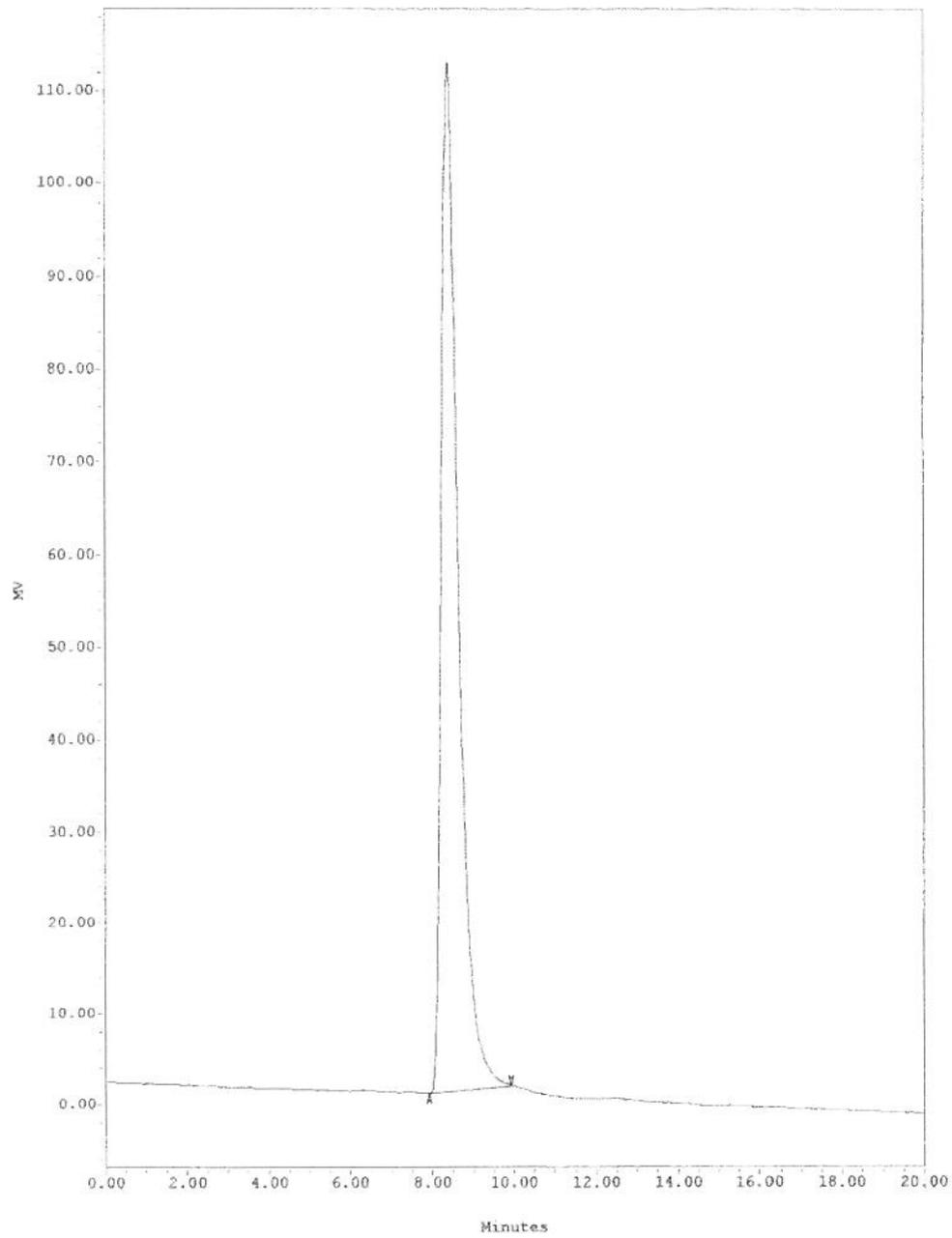


Figura D.3: Cromatograma da amostra C.

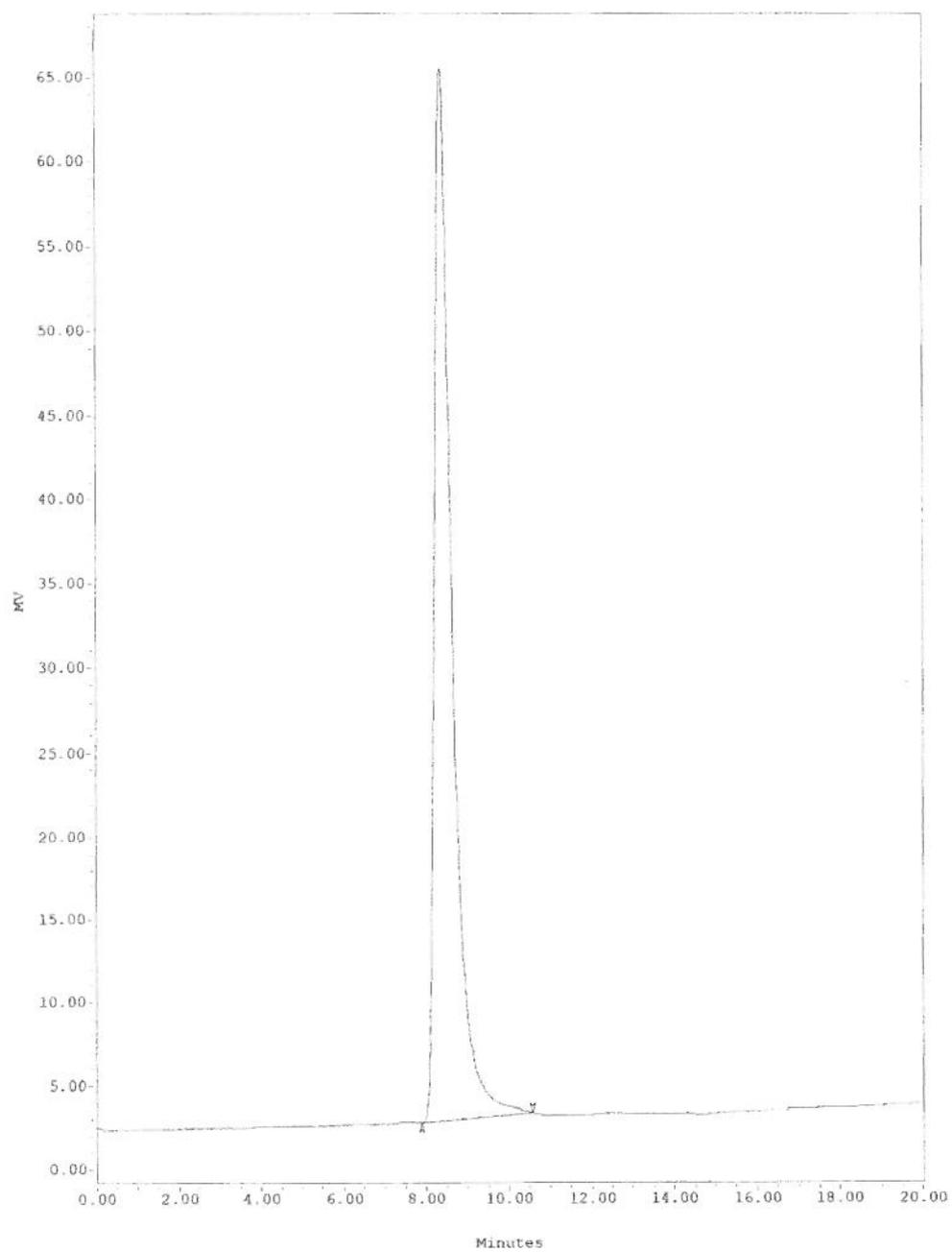


Figura D.4: Cromatograma da amostra D.

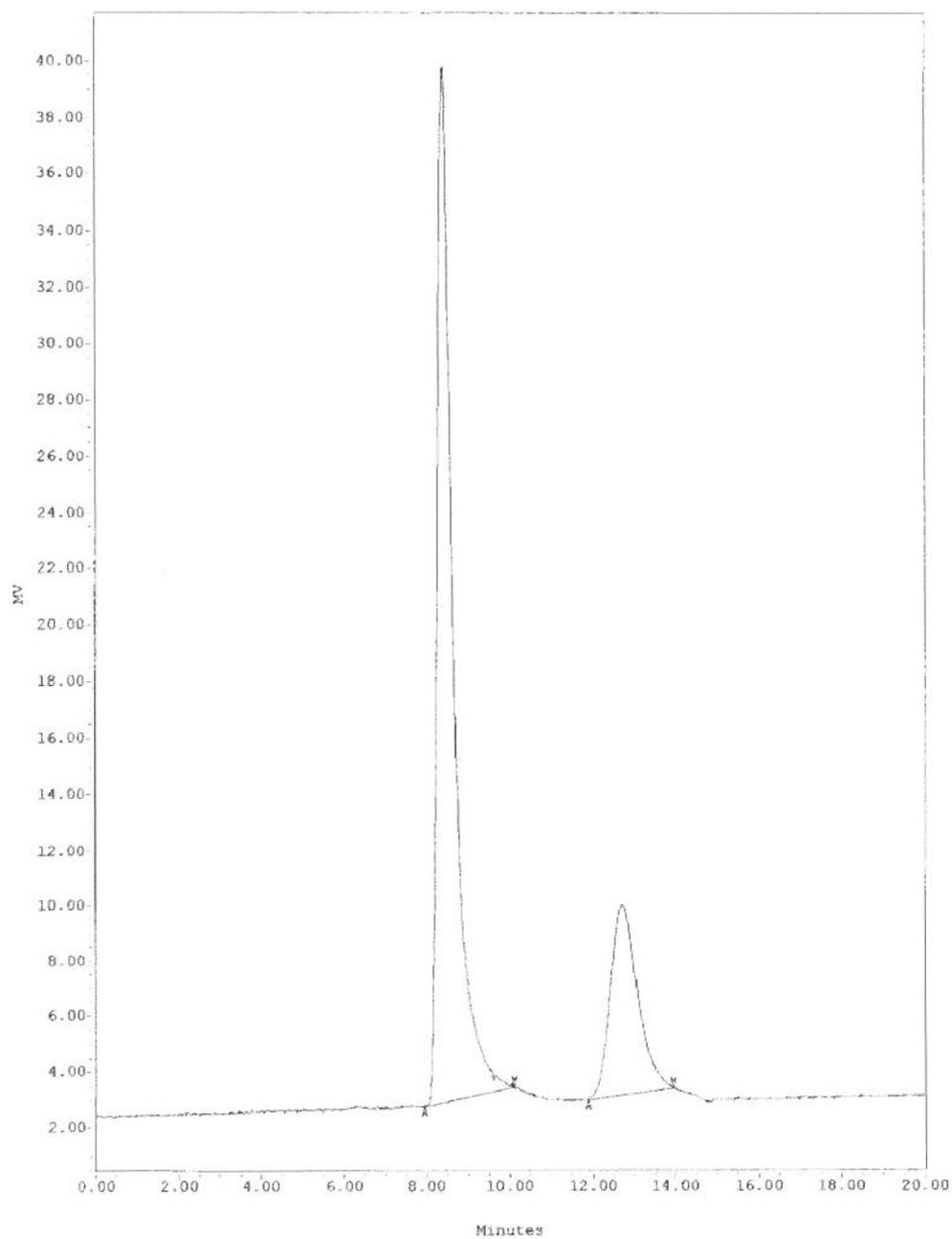


Figura D.5: Cromatograma da amostra E.

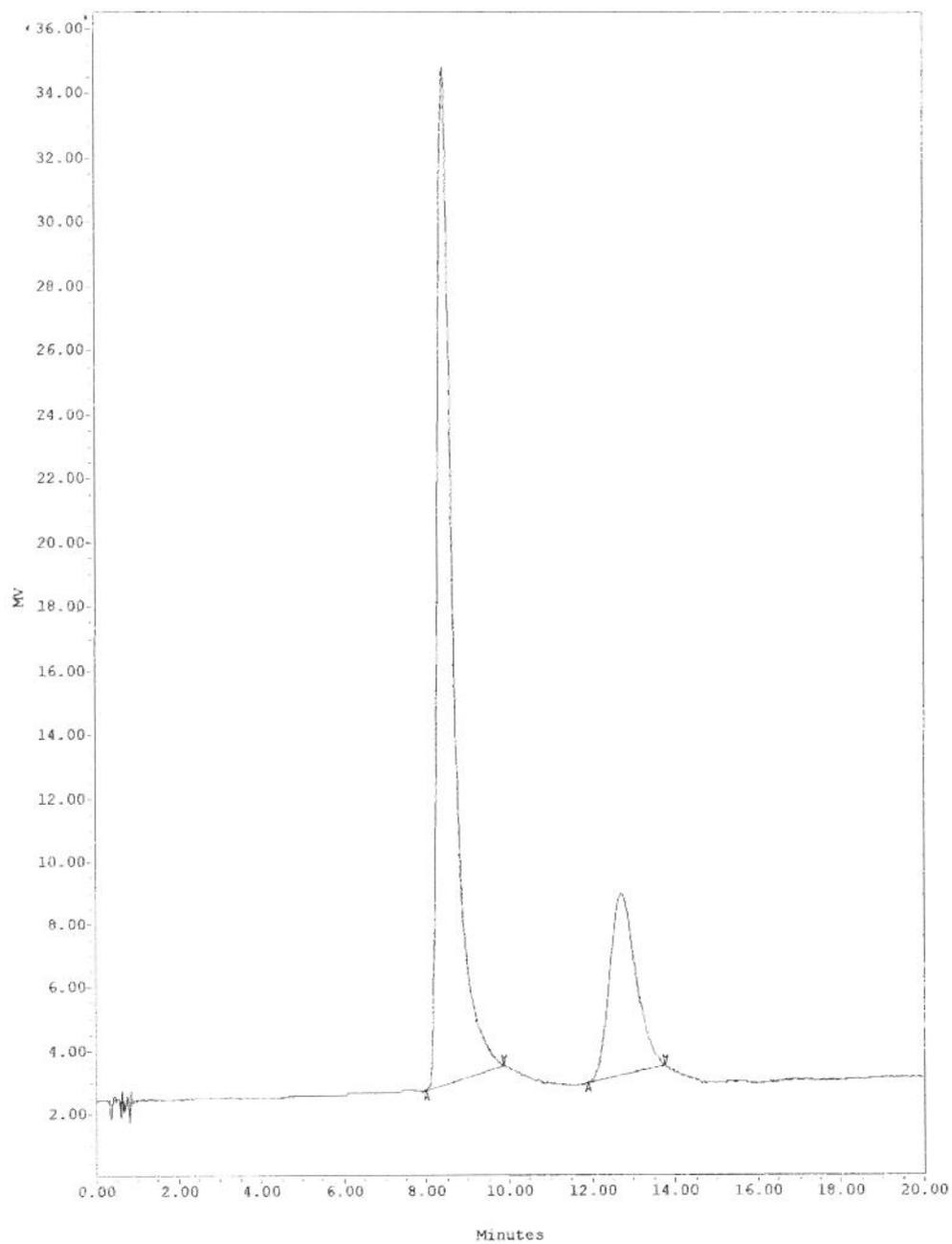


Figura D.6: Cromatograma da amostra F.

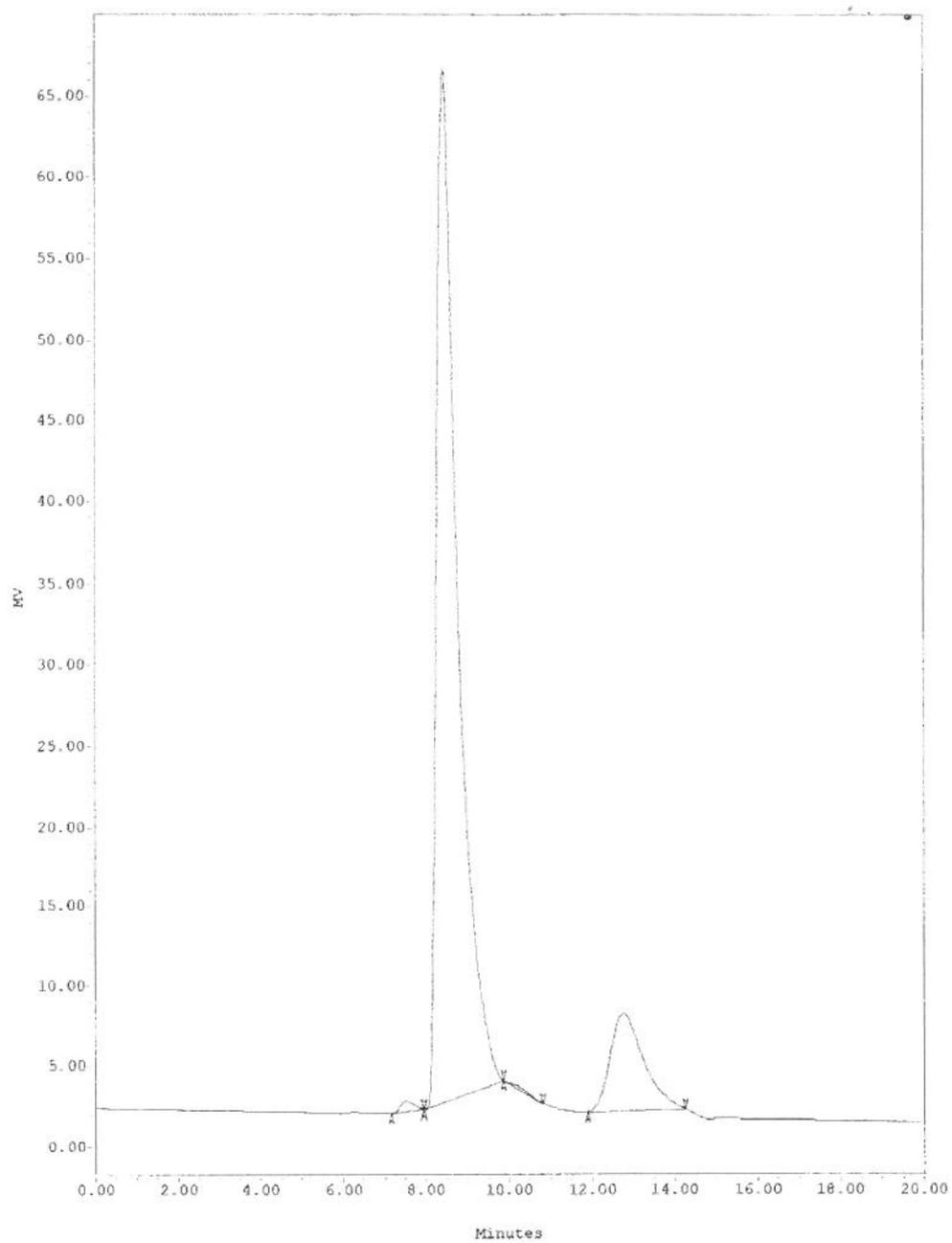


Figura D.7: Cromatograma da amostra G.

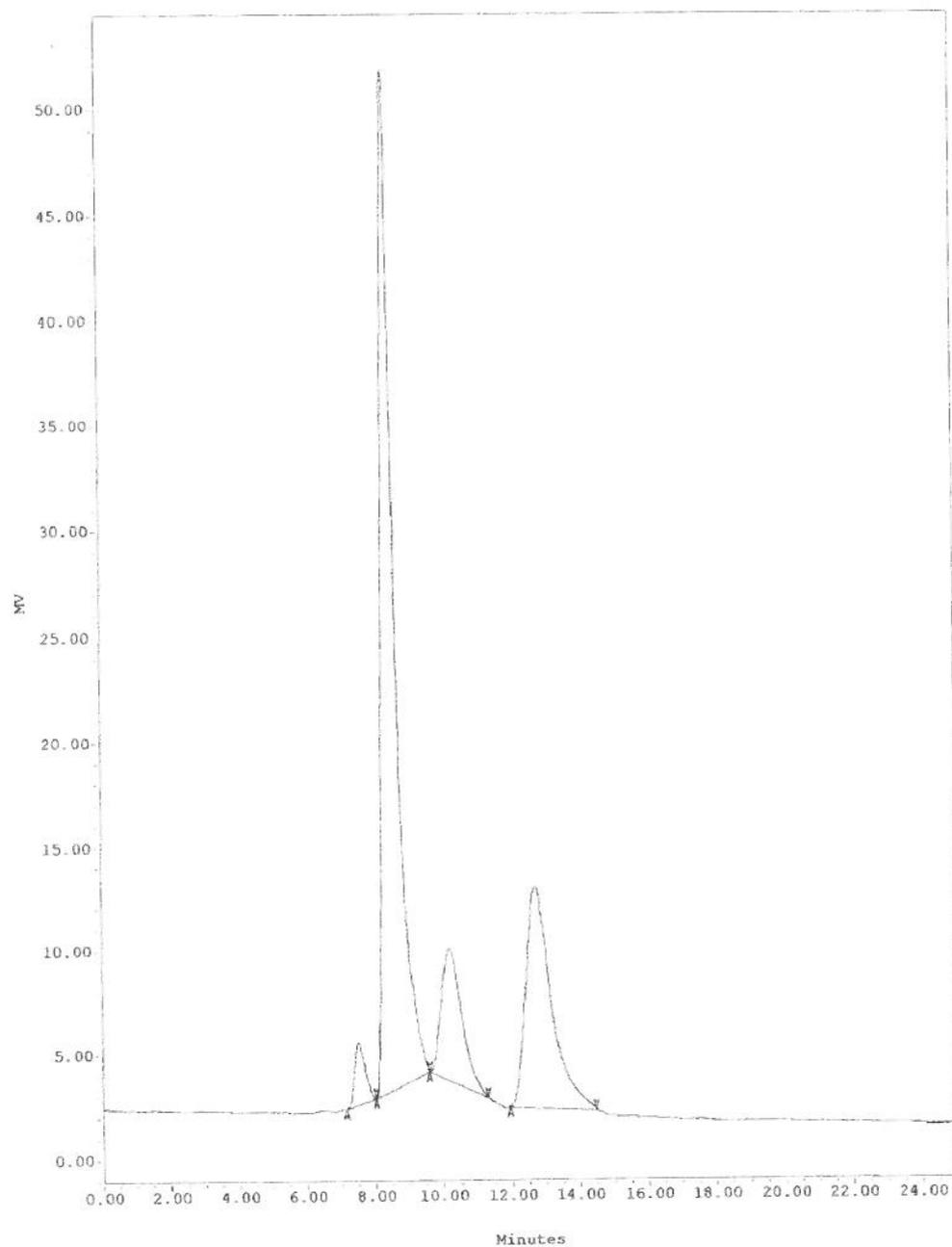


Figura D.8: Cromatograma da amostra H.

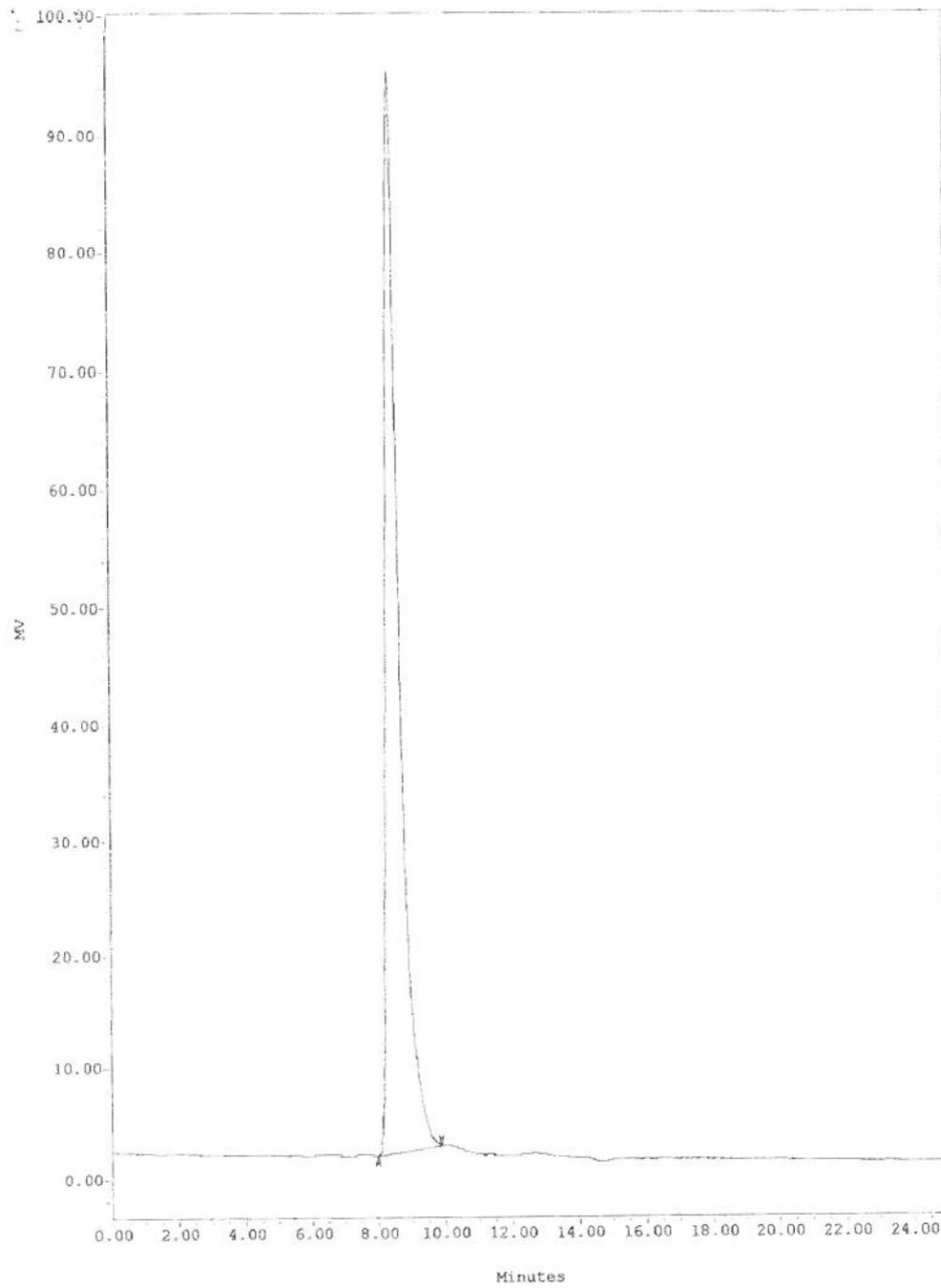


Figura D.9: Cromatograma da amostra I.