

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – CAMPUS POÇOS DE CALDAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JOSIVAN DE SOUSA CUNHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE DE
Aspergillus oryzae IPT-301 VISANDO A OBTENÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Poços de Caldas / MG
2017

JOSIVAN DE SOUSA CUNHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE DE
Aspergillus oryzae IPT-301 VISANDO A OBTENÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito final para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Co-Orientador: Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano

Poços de Caldas / MG

2017

C972p Cunha, Josivan de Sousa.

Produção e caracterização da enzima frutotransferase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos / Josivan de Sousa Cunha. – Poços de Caldas, 2017.

96 f. –

Orientador: Rafael Firmani Perna.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

Bibliografia.

1. Análise enzimática. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Fermentação. I. Perna, Rafael Firmani. II. Título.

CDD: 660

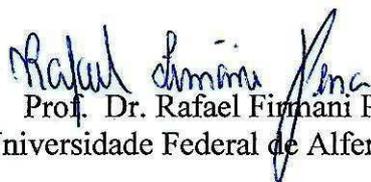
JOSIVAN DE SOUSA CUNHA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE DE
Aspergillus oryzae IPT – 301 VISANDO A OBTENÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

A banca examinadora abaixo assinada, aprova a dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito final para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Engenharia Química

Aprovado em 12 de maio de 2017.



Prof. Dr. Rafael Firmani Perna

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG



Prof. Dr. Daniela Battaglia Hirata

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Instituição: Universidade Estadual de Campinas - Unicamp



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

*Dedico a Deus, minha mãe e meus amigos,
que me proveram afeto e suporte nas mais
diversas adversidades enfrentadas.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu força e conhecimento para cumprir mais uma etapa de minha vida acadêmica. Aos meus familiares, pais e companheiros, pela mão amiga nos momentos mais difíceis desta jornada.

Ao meu orientador e coordenador do curso de Pós-Graduação em Engenharia Química Prof. Dr. Rafael Firmani Perna pelo profissionalismo, apoio, paciência, companheirismo, amizade e principalmente o ensino de uma linguagem nova a todos nós.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano, pelas palavras sábias nos momentos de dúvidas.

Aos integrantes do LBP (Laboratório de Bioprocessos), a citar os mestrandos Marcela Oliveira, Rogério Lopes Garcia e Thais Miranda, e os alunos de IC Geisa, Raquel, Marcos.

Ao meu parceiro José Pedro Zanetti Prado, aluno de iniciação a quem pude co-orientar e acompanhar em todo o seu aprendizado, além das horas intermináveis no laboratório na qual este me ajudava sem reclamações e sempre com um sorriso no rosto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais pelo apoio financeiro.

Aos Professores Dr. Rodrigo Corrêa Basso e Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg, aos demais professores e aos funcionários pela amizade conferida e que ajudam este magnífico projeto no seu dia-a-dia.

Aos discentes do curso de Pós-Graduação em Engenharia Química pela amizade e apoio mútuo nos momentos felizes e difíceis.

Obrigado a todos!

“Muitas vezes as coisas que me pareceram verdadeiras quando comecei a concebê-las tornaram-se falsas quando quis colocá-las sobre o papel”.

René Descartes

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, cujas unidades frutossil estão ligadas na posição β -(2 \rightarrow 1) na molécula de sacarose. Esses açúcares, de baixa caloria, são classificados com prebióticos, não são cariogênicos, podem ser usados por diabéticos, são de 0,4 a 0,6 vezes menos doce que a sacarose, sendo amplamente utilizados pelas indústrias farmacêutica e de alimentos como açúcares funcionais. Apesar dos FOS serem produzidos naturalmente por enzimas presentes em diversos vegetais, são disponibilizados comercialmente por meio da produção sintética, utilizando enzimas de origem microbiana como as frutossiltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9) e sacarose como principal substrato. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de FTases extracelular e micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa aeróbia utilizando meio de cultura sintético, assim como a caracterização e estudos cinéticos das enzimas produzidas. Também foram investigados os efeitos da temperatura e pH do meio reacional nas atividades enzimáticas mediante técnica de planejamento experimental. Para a produção de FTases foi necessário o cultivo do micro-organismo em meio de cultura estéril e a fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker. Com o caldo de fermentação filtrado e o micélio úmido foi possível determinar as atividades de transfrutossililação (quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de FOS por minuto nas condições experimentais) e hidrolítica (quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de frutose por minuto nas condições experimentais) extracelular e micelial, respectivamente, para as diferentes condições experimentais avaliadas. A concentração máxima de biomassa celular obtida foi de $9,35 \pm 1,26$ g.L⁻¹ em 48 h de fermentação, sendo que em 76 h, houve a produção de $7,51 \pm 1,57$ g.L⁻¹, período em que ocorreu a acidificação do caldo fermentado (pH 4,82). As condições nas quais a enzima extracelular obteve maior atividade de transfrutossililação foi aquela produzida em 64 h de fermentação, incubada na faixa de pH 4,5-6,0, temperatura reacional de 50 °C, concentração de sacarose a partir de 296,0 g.L⁻¹, apresentando estabilidade entre 30 e 35 °C e em pH 6,0. Por outro lado, a FTase micelial mostrou sua máxima atividade quando produzida em 72 h de fermentação, incubada na faixa de pH 4,5-6,0, temperatura reacional entre 45-55 °C, concentração de substrato igual a 470,6 g.L⁻¹, indicando estabilidade para faixas de pH entre 6,0-8,0 e temperatura entre 30-40 °C. A FTase extracelular apresentou cinética michaeliana em relação à concentração de substrato, exibindo valores de V_{max} igual a 16,23 U.mL⁻¹ e K_m de 50,41 g.L⁻¹, enquanto a FTase micelial ajustou-se satisfatoriamente ao Modelo de Hill, cujos valores dos parâmetros V_{max} , $K_{0,5}$ e n foram iguais a 342,23 U.g⁻¹ e 234,73 g.L⁻¹ e 1,41, respectivamente. O estudo da influência do tempo e da temperatura reacional na síntese de FOS mostrou que a FTase extracelular produziu maior concentração de FOS a 50 °C, enquanto a FTase micelial a 40°C. A otimização do processo para a obtenção de FOS comprovou que a zona ótima da FTase extracelular (em que elevada atividade de transfrutossililação e baixa atividade hidrolítica são esperadas) ocorreu nas faixas de temperatura entre 45-50 °C e de pH entre 5,5-6,75. Para a FTase micelial, apenas a atividade de transfrutossililação ajustou-se satisfatoriamente ao modelo quadrático com interação, cuja zona ótima ocorreu em temperaturas superiores a 46 °C e valores de pH abaixo de 6,5. Os resultados obtidos atestaram que o fungo se destacou como fonte produtora de FTases e, estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a obtenção de FOS em escala laboratorial.

Palavras-Chave: Frutossiltransferase. *Aspergillus oryzae* IPT-301. Fermentação submersa. Caracterização enzimática. Frutooligossacarídeos.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are fructose oligomers in which the fructosyl units are bound in β -(2 \rightarrow 1) position of sucrose molecule. These sugars, that present properties such as low caloric value and non-cariogenicity, are classified as prebiotics and can be used in diabetic products; they are 0.4 to 0.6 times less sweet than sucrose, being widely applied in the pharmaceutical and food industries as functional sugars. Despite the natural production of FOS by enzymes present in various vegetables, they are commercially available by synthetic production, using microbial enzymes such as fructosyltransferases (FTases, E.C.2.4.1.9) and sucrose as main substrate. In face of this context, the objective of the present study was the production of extracellular and mycelium FTases by *Aspergillus oryzae* IPT-301 from aerobic submerged fermentation using synthetic growth media, as well as the characterization of the enzymes produced and the conduction of kinetic studies. It was also investigated the temperature and pH effects of the growth media in the enzymatic activities through experimental planning. For FTases production was necessary the use of sterile growth media, and the fermentation was carried out in rotary shaker. With the filtered broth and the humid mycelium it was possible to determine the transfructosylation and hydrolytic activities of the extracellular and mycelium enzymes in different experimental conditions; the transfructosylation activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 μ mol of FOS per minute under the experimental conditions, while the hydrolytic activity was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μ mol of fructose per minute under the experimental conditions. The maximum biomass concentration (9.35 ± 1.26 g.L⁻¹) was obtained in 48 h of fermentation; in 76 h there was a biomass production of 7.51 ± 1.57 g.L⁻¹ and the acidification of the fermented broth (pH 4.82). The conditions in which was observed the maximum transfructosylation activity of the extracellular enzyme were 64 h of fermentation, pH range of 4.5 to 6.0, reactional temperature of 50 °C and sucrose concentration from 296.0 g.L⁻¹; the thermal stability was between 30 and 35 °C and pH 6.0. On the other hand, mycelium FTase had its optimum in 72 h of fermentation, pH range of 4.5 to 6.0, reactional temperature between 45-55 °C and substrate concentration of 470.6 g.L⁻¹; the thermal stability was between 30 and 40 °C and pH range 6.0 to 8.0. Extracellular FTase presented michaelian kinetic according to substrate concentration, showing V_{max} and K_m values of 16.23 U.mL⁻¹ and 50.41 g.L⁻¹, while micelial FTase fitted to Hill Model, whose V_{max} , $K_{0.5}$ e n values was 342.23 U.g⁻¹ e 234.73 g.L⁻¹ and 1.41, respectively. The study of reaction's time and temperature showed that extracellular FTase produced a maximum concentration of FOS at 50 °C, while the micelial one at 40 °C. The process optimization for FOS production verified that the optimum zone for extracellular FTase, in which are expected high transfructosylation and low hydrolytic activities, occurred in temperature range of 45 - 50 °C and pH range of 5.5 - 6.75. For mycelium FTase, only the transfructosylation activity presented a satisfactory adjustment to the quadratic model with interaction, in which the optimum zone occurred in temperatures above 46 °C and pH values below 6.5. The results obtained showed that the fungus stood out as source of FTase, and these enzymes presented themselves as promising sources for FOS production in laboratorial scale.

Keywords: *Aspergillus oryzae* IPT-301. Submerged fermentation. Fructosyltransferase. Enzymatic characterization. Fructooligosaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose, (E) 6-kestose, (F) 6,6-nistose, (G) neokestose, (H) neonistose e (I) neofrutofuranosilnistose.....	18
Figura 2 - Esquema da reação de transfrutossilacção.	25
Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou FOS.	27
Figura 4 - Rota esquemática de produção de FOS.	32
Figura 5 - Concentração da biomassa celular de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 e progressão do pH em função do tempo a 30°C.....	50
Figura 6 - Curva de crescimento do <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 em termos de logaritmos de concentração de biomassa a 30°C.	52
Figura 7 - Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.....	53
Figura 8 - Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.	54
Figura 9 - Influência do pH nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06% (m/v) a 50 °C e tampão tris acetato 0,2 mol.L ⁻¹	56
Figura 10 - Influência do pH nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C, tampão tris acetato 0,2 mol.L ⁻¹	58
Figura 11 - Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.....	59
Figura 12 - Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.....	60
Figura 13 - Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.	62
Figura 14 – Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo cinético de Michaelis-Menten (linha contínua) para a FTase extracelular a 50 °C em tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5).	63
Figura 15 - Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase micelial e na razão (A_t/A_h) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ pH 5,5.....	64
Figura 16 – Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo cinético de Hill (linha contínua) para a FTase micelial a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5).	66
Figura 17 – Estabilidade da FTase extracelular frente ao pH após 24 h de incubação em solução de tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ a 4 °C. Atividade de transfrutossilacção a 100% de $14,96 \pm 1,62$ U.mL ⁻¹	68

Figura 18 – Estabilidade da FTase micelial frente ao pH após 24 h de incubação em solução de tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ a 4 °C. Atividade de transfrutossilção a 100% de 189,23 ± 37,82 U.g ⁻¹	69
Figura 19 - Estabilidade térmica da FTase extracelular avaliada para diferentes temperaturas após incubação por 1 h em tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5. Atividade de transfrutossilção a 100% de 22,65 ± 0,72 U.mL ⁻¹	70
Figura 20 - Estabilidade térmica da FTase micelial avaliada para diferentes temperaturas após incubação por 1 h em tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,5. Atividade de transfrutossilção a 100% de 418,56 ± 58,44 U.mL ⁻¹	70
Figura 21- Influência do tempo e da temperatura da reação enzimática na produção de FOS sintetizado por FTase extracelular em solução de sacarose 47,06 % (m/v), tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5) e agitação de 200 rpm.....	72
Figura 22- Influência do tempo e da temperatura da reação enzimática na produção de FOS sintetizado por FTase micelial em solução de sacarose 47,06 % (m/v), tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5) e agitação de 200 rpm.	73
Figura 23 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular.....	75
Figura 24 - (A) Superfície de resposta para a atividade de transfrutossilção extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático; (B) Curvas de contorno para a atividade de transfrutossilção extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático.	77
Figura 25 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH significativos na atividade hidrolíticas da FTase extracelular.....	78
Figura 26 - (A) Superfície de resposta para a atividade hidrolítica extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático; (B) Curvas de contorno para a atividade hidrolítica extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional.	79
Figura 27 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH significativos na atividade de transfrutossilção da FTase micelial.	81
Figura 28 - (A) Superfície de resposta para a atividade de transfrutossilção micelial em função do pH e temperatura do meio reacional; (B) Curvas de contorno para a atividade de transfrutossilção micelial em função do pH e temperatura do meio reacional.....	82
Figura 29 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade hidrolítica da FTase micelial.....	83
Figura 30 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores.	96
Figura 31 - Curva analítica do método GOD - PAP para determinação de glicose.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais micro-organismos produtores de β -frutofuranosidase EC 3.2.1.26.....	28
Tabela 2 - Micro-organismos produtores de FTase EC 2.4.1.9.....	30
Tabela 3 - Principais substratos alvo da FTase e respectivos produtos.....	30
Tabela 4 - Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais.....	49
Tabela 5 - Coeficiente de determinação de erro do modelo de Michaelis-Menten para a FTase extracelular.....	62
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da FTase extracelular.....	63
Tabela 7 - Coeficientes de determinação de erro obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial.....	66
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da FTase micelial.....	67
Tabela 9 - Avaliação da linearidade da reação de tranfrutossilacção extracelular em solução de sacarose com concentração inicial de 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5), agitação orbital de 200 rpm, durante o tempo limite de 120 minutos em diversas temperaturas.....	71
Tabela 10 - Avaliação da linearidade da reação de tranfrutossilacção micelial em solução de sacarose com concentração inicial de 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L ⁻¹ (pH 5,5), agitação orbital de 200 rpm, durante o tempo limite de 120 minutos em diversas temperaturas.....	72
Tabela 11- Matriz do delineamento e respostas para a otimização da FTase extracelular produzida em 64 h de fermentação com atividades enzimáticas obtidas a partir de solução de sacarose 470,6 g.L ⁻¹	74
Tabela 12 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades de transfrutossilacção da FTase extracelular.....	75
Tabela 13 - Resultados da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade de transfrutossilacção para a FTase extracelular.....	76
Tabela 14 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades hidrolíticas da FTase extracelular.....	78
Tabela 15 - Resultados da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade hidrolítica para a FTase extracelular.....	79
Tabela 16 - Matriz do delineamento e respostas para a otimização da FTase micelial produzida em 64 h de fermentação com atividades medidas em 470,6 g.L ⁻¹ de concentração de sacarose.....	80
Tabela 17 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades de transfrutossilacção da FTase micelial.....	81
Tabela 18- Resultados da ANOVA para o modelo quadrático com interação descrito pelos efeitos de temperatura e pH na atividade de transfrutossilacção da FTase micelial.....	82
Tabela 19 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade hidrolítica da FTase micelial.....	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Estrutura química e classificação dos frutooligosacarídeos	17
3.2	FOS e saúde	20
3.3	Aplicações dos FOS	22
3.4	Síntese enzimática de FOS	23
3.4.1	Reação e atividade de transfrutossilação (A_t)	25
3.4.2	Reação e atividade hidrolítica (A_h)	26
3.4.3	Razão A_t/A_h	27
3.4.4	Inulinases microbianas	27
3.4.5	β -frutofuranosidase (FFase)	28
3.4.6	Frutossiltransferase (FTase)	29
3.4.7	Fontes de enzimas produtoras de FOS	30
3.4.8	Mecanismo de reação enzimática da FFase e FTase	31
3.5	Produção de FOS	33
3.6	Inibição enzimática	35
3.7	Propriedades físico-químicas da FTase e FFase	36
3.8	Cinética enzimática	36
3.8.1	Aspectos gerais da cinética enzimática	37
3.8.2	Efeitos da temperatura na cinética enzimática	39
3.8.3	Efeitos do pH na cinética enzimática	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Micro-organismo e condições de cultivo	41
4.2	Meio de Cultura	41
4.3	Construção da curva de crescimento microbiana	41
4.4	Monitoramento da progressão do pH do caldo de fermentação ao longo do tempo	42
4.5	Produção de FTases micelial e extracelular por fermentação submersa aeróbia	42
4.6	Determinação da atividade enzimática	42
4.6.1	Determinação das atividades de transfrutossilação e hidrolítica extracelulares	43
4.6.2	Determinação das atividades de transfrutossilação e hidrolíticas miceliais	44
4.7	Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)	45
4.8	Determinação da concentração de glicose	46

4.9	Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica e de transfrutossilagem	46
4.10	Influência da temperatura do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutossilagem	47
4.11	Estabilidade térmica da FTase extracelular e micelial	47
4.12	Influência do tempo e da temperatura reacionais na produção de FOS	47
4.13	Influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutossilagem	48
4.14	Estabilidade ao pH da FTase extracelular e micelial	48
4.15	Influência da concentração de sacarose do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilagem e hidrolíticas e estudo da cinética enzimática da FTase	48
4.16	Otimização das atividades enzimáticas extracelular e micelial em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1	Estudos de produção de FTases extracelular e micelial	50
5.1.1	Construção da curva de crescimento microbiana e monitoramento do pH do caldo de fermentação	50
5.1.2	Influência do tempo de fermentação nas atividades de transfrutossilagem e hidrolítica	52
5.2	Estudos de caracterização das FTases extracelular e micelial	55
5.2.1	Influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilagem e hidrolítica	55
5.2.2	Influência da temperatura do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilagem e hidrolítica	58
5.2.3	Influência da concentração de sacarose do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilagem e hidrolíticas e estudo da cinética enzimática da FTase	61
5.2.4	Efeito do pH na estabilidade das FTases extracelular e micelial	67
5.2.5	Efeito da temperatura na estabilidade das FTases extracelular e micelial	69
5.2.6	Influência do tempo e da temperatura reacionais na produção de FOS	71
5.3	Otimização das atividades enzimáticas extracelular e micelial em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático	73
6	CONCLUSÕES	84
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE	95

1 INTRODUÇÃO

Uma crescente demanda por alimentos mais saudáveis com baixo valor calórico, nos últimos anos, se deve ao aumento da preocupação da sociedade com a saúde e qualidade de vida. Assim, os alimentos funcionais, em especial os prebióticos e probióticos, são constantemente incorporados à dieta humana, pois além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (SAAD, 2006). De acordo com a agência Mordor Intelligence (2017), o mercado mundial de alimentos funcionais foi avaliado em US\$ 205,39 bilhões no ano de 2016, com expectativa de valorização até o ano de 2022, podendo atingir a marca dos US\$ 294,79 bilhões.

Segundo Fortes e Muniz (2009) alimentos prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, que resultam em benefícios à saúde e ao bem-estar. Para os alimentos serem considerados como prebióticos, estes devem ser resistentes à acidez gástrica, não sofrer hidrólise por enzimas de mamíferos e não serem absorvidos pelo trato gastrointestinal, além de estimular o crescimento seletivo de bactérias intestinais benéficas à saúde humana (ROBERFROID, 2007).

Dentre os edulcorantes alternativos que possuem propriedades prebióticas, os mais estudados e consumidos são os oligossacarídeos, que são carboidratos compostos por resíduos de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas, com grau de polimerização entre 2 a 10, presentes em diversos produtos naturais, ou obtidos por processos químicos ou enzimáticos. No entanto, são os frutooligossacarídeos (FOS) que tem melhor representado a classe de açúcares não convencionais, visto que suas propriedades funcionais são amplas, possuem sabor semelhante e poder edulcorante inferior à sacarose além de serem produzidos de forma relativamente simples (EGGLESTON; CÔTE, 2003; NAKAKUKI, 2002; YUN, 1996). Segundo informações do Credence Research (2017), o mercado mundial de frutooligossacarídeos foi avaliado em US\$ 344 milhões no ano de 2014 com perspectiva de crescimento de 13,1 % entre os anos de 2015 a 2022.

Os FOS são classificados como fibras alimentares e açúcares não cariogênicos, fermentados preferencialmente pelas bifidobactérias presentes na flora do cólon intestinal, o que possibilita a redução do pH do bolo fecal e, como consequência, a eliminação de microorganismos patogênicos. Também melhoram a absorção de sais minerais como o cálcio, magnésio e ferro, além de diminuir o nível de colesterol total, fosfolipídios e triacilgliceróis no

sangue. Os FOS apresentam cerca de 40 a 60 % do poder edulcorante da sacarose, sendo um possível substituto deste, pois uma solução de FOS apresenta maior viscosidade e estabilidade térmica quando em mesma proporção que a sacarose, propriedades altamente visadas pela indústria (ANDERSSON et al., 1999; MARX et al., 2000; RIVERO-URGEL e SANTAMARIA-ORLEANS, 2001; SPIEGEL et al., 1994). Os FOS custam até cerca de 150 euros por quilograma e são utilizados como componentes de diversos produtos funcionais (DOMINGUES et al., 2014).

Os FOS, encontrados em pequenas quantidades em diversos vegetais como aspargos, alcachofra de Jerusalém, chicória, cebola e batata doce, são produzidos principalmente pela ação enzimática da frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), da β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) e da inulinase (EC 3.2.1.7) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MONSAN; PAUL, 1995; MUTANDA et al., 2014). Tais enzimas são de origem vegetal e microbiana, contudo, as enzimas microbianas são bem mais aplicadas e difundidas, visto que os micro-organismos apresentam um ciclo de vida curto, baixo custo de produção da enzima e ausência de sazonalidade (HERNALSTEENS, 2006).

Ao promover a síntese de FOS via transferência de grupos frutossil para moléculas de sacarose ou mesmo outros FOS de cadeia curta como a 1-kestose, a nistose, e a frutofuranosilnistose, a FTase possui vantagem perante a FFase e a inulinase, ocasionando maiores rendimentos com menos subprodutos. Diversos são os micro-organismos reportados na literatura como fontes produtoras desta enzima, com destaque para os fungos *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhodoturola diarensis*, *Cryptococcus* sp. (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; GANAIE et al., 2014; MUTANDA et al., 2014).

No entanto, a FTase produzida pela cepa *Aspergillus oryzae* IPT-301 apresenta elevada atividades de transfrutossilacção quando soluções concentradas de sacarose são utilizadas como substrato, o que acarreta, conseqüentemente, a elevada produção de frutooligossacarídeos. É de interesse industrial a utilização de cepas microbianas produtoras de FTase com elevada atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica dos FOS obtidos, afim de se obter rendimentos satisfatórios (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; HIDAKA et al., 1988; HIDAKA et al., 1986). Além disso, o *A. oryzae* IPT-301 produz a FTase na forma extracelular, obtida durante o processo fermentativo e expelida no caldo de fermentação como metabólito, e na forma micelial, isto é, a enzima aderida à célula fúngica, tornando possível o uso desta como biocatalisador do tipo células integras.

O uso de células integras apresenta importante vantagem em relação às enzimas isoladas por não ser necessário a reciclagem de co-fatores, além de que, por estarem aderida no micélio, estão em ambiente celular, o que confere proteção perante efeitos que possam desestabilizá-las ou degradá-las. Contudo, faz-se necessário que o substrato seja capaz de difundir através da membrana celular (JOHANNES et al., 2006; SCHÜÜRMAN et al., 2014).

O *Aspergillus oryzae* IPT-301 já mostrou ser capaz de suprir essas necessidades, conforme apresentado nos trabalhos de Cuervo-Fernandez et al., 2007, Ottoni et al., 2012 e Maiorano et al., 2009. Contudo, não há registros na literatura de estudos mais aprofundados do comportamento deste fungo e da caracterização das enzimas extracelular e micelial produzidas. Portanto, o presente trabalho visou produzir FTases mediante fermentação submersa aeróbia, avaliar os efeitos de pH, temperatura e concentração do substrato nas atividades enzimáticas, bem como estudar o comportamento cinético da enzima e otimizar o processo de obtenção de FOS em escala laboratorial por meio da técnica de planejamento experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho centrou-se na produção, em escala laboratorial, de frutossiltransferases extracelular e micelial de *Aspergillus oryzae* IPT-301 por fermentação submersa aeróbia, utilizando meio de cultura sintético e nos estudos de caracterização das enzimas produzidas.

2.2 Objetivos específicos

Visando atingir o objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- a) Construção e avaliação da curva de crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301;
- b) Construção e avaliação da curva de progresso do pH do meio de cultura ao decorrer do processo de fermentação;
- c) Estudo do efeito do tempo de fermentação nas atividades de transfrutossililação (A_t), hidrolítica (A_h) e na razão entre as atividades (A_t/A_h);
- d) Estudo dos efeitos do pH, temperatura e concentração de substrato do meio reacional nas atividades de transfrutossililação (A_t), hidrolítica (A_h), bem como na razão entre as atividades (A_t/A_h);
- e) Obtenção dos parâmetros cinéticos das enzimas extracelular e micelial;
- f) Avaliação dos efeitos térmicos e de pH na estabilidade da enzima;
- g) Avaliação da influência do tempo e temperatura reacionais na produção de FOS;
- h) Otimização do processo de obtenção de FOS, em pequena escala, mediante aplicação da técnica de planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Estrutura química e classificação dos frutooligossacarídeos

Frutanos referem-se ao nome genérico dado à classe de polímeros de frutose, majoritariamente com ligações do tipo frutossil-frutose (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001), incluindo tanto oligômeros pequenos quanto polímeros com mais de 10000 resíduos, cuja massa molecular varia entre 1,0 e 4,5 kDa (KORIR; LARIVE, 2007).

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose com grau de polimerização variando entre 2 e 20, ou seja, oligossacarídeos de cadeia curta, que consistem em uma molécula de sacarose alongada por uma cadeia de unidades de frutossil, conectadas por meio de ligações glicosídicas, possuindo a estrutura genérica GF_n (em que G se refere à molécula de glicose, F de frutose e n ao número de unidades do grupo frutossil) (YUN et al., 1990). O comprimento da cadeia, a presença da ligação do tipo β e as possíveis ramificações tornam estes compostos resistentes à hidrólise por enzimas digestivas no trato intestinal superior e conseqüentemente são classificados como fibras solúveis (NINESS, 1999).

De acordo com Roberfroid (2007) e Saad (2006), tanto as oligofrutoses quanto os FOS são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos com grau de polimerização inferior a 10. O termo oligofrutose é mais utilizado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, enquanto FOS é utilizado para descrever misturas de frutanos de cadeia curta sintetizados a partir da sacarose.

Existem diversos tipos de frutanos na natureza, sendo estes distinguidos com base nas ligações glicosídicas pela qual os resíduos de frutose são ligados entre si.

Eggleston e Côte (2003) classificam as principais séries de FOS como:

- (i) inulino-FOS (1F -FOS), que consistem de uma cadeia linear não-redutora com ligações entre os grupos frutossil do tipo β -(2 \rightarrow 1), cujos principais compostos são a 1-kestose (1F - β -D-frutofuranosilsucrose) identificado por GF_2 , a 1-nistose [1F (1F - β -D-frutofuranosilsucrose) $_2$ -sucrose] identificado por GF_3 e o 1F - β -D-frutofuranosilnistose identificado por GF_4 ;
- (ii) levano-FOS (6F -FOS) que possuem ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6), entre as unidades de frutossil, como por exemplo a 6-kestose (6F - β -D-frutofuranosilsucrose).
- (iii) séries neo-FOS (6G -FOS), onde os grupos frutossil ligam-se diretamente à metade glicosil da sacarose por meio de ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6), como por exemplo a

neo-kestose (${}^6G\text{-}\beta\text{-D-frutofuranosilsucrose}$), o que possibilita o alongamento da cadeia pelos resíduos de D-Frutose tanto ligações $\beta\text{-}(2\rightarrow1)$ quanto $\beta\text{-}(2\rightarrow6)$.

Os primeiros componentes das séries inulino-FOS, levano-FOS e neo-FOS estão representados na Figura 1.

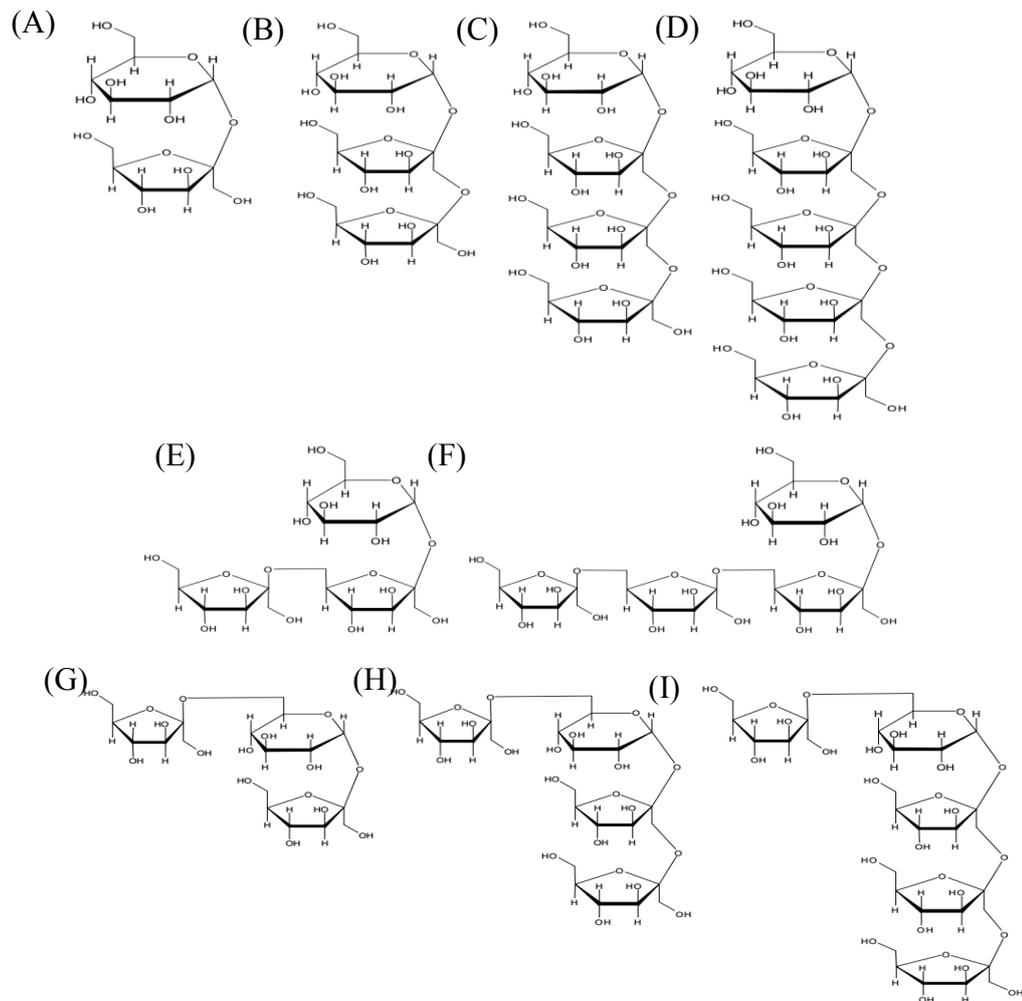


Figura 1 - Estruturas químicas da sacarose e dos principais frutanos: (A) sacarose, (B) 1-kestose, (C) nistose, (D) frutofuranosilnistose, (E) 6-kestose, (F) 6,6-nistose, (G) neokestose, (H) neonistose e (I) neofrutofuranosilnistose.

Fonte: do autor.

Segundo Crittenden e Playne (1996), existem 12 classes de oligossacarídeos de grau alimentar atualmente comercializados, a quais inclui, além dos já previamente citados, a glicosilssacarose, os maltoligossacarídeos, os isomaltoligossacarídeos, os galactoligossacarídeos, os xiloligossacarídeos, a palatinose, entre outros. Lewis et al. (1993) verificaram

ainda a existência das fleínas, com estrutura similar aos levano-FOS, porém com reduzido grau de polimerização e baixo peso molecular ($DP < 100$).

Hebette et al. (1998) definiram que os FOS são comumente derivados da inulina e referidos como inulooligosacarídeos (IOS). A inulina é o carboidrato de armazenamento energético de raízes e tubérculos de plantas como alcachofra de Jerusalém, chicória, dalias, e possui exclusivamente ligações frutossil-frutose do tipo β -(2 \rightarrow 1) com uma unidade de D-glucopiranosose (D-Glup) terminal. Em alguns casos, ocorre a ausência da unidade de glicosil terminal, acarretando a produção de xaropes contendo inulobiose (F_2), inulotriose (F_3), inulotetose (F_4), e uma mistura diversa de FOS (GF_{2-5}) (CHI et al., 2009; CHO; YUN, 2000; RICCA et al., 2009).

Estudos reportados por Mutanda et al. (2014) indicaram que os FOS podem ser produzidos enzimaticamente a partir do alongamento da molécula de sacarose mediante ação de enzimas com atividade de transferência dos grupos frutossil ou via hidrólise enzimática da inulina por exoinulinases e endoinulinases atuando sozinhas ou sinergicamente. Em ambos os casos, quantidades de frutose e glicose são formados como subprodutos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Os FOS ocorrem naturalmente em diversos alimentos, como frutas, hortaliças e mel (MUNJAL et al., 2009), em quantias de traços. As maiores fontes de inulina são a chicória e alcachofra de Jerusalém, cujo conteúdo em base fresca varia entre 10 a 20%. Podem ser encontrados também em cebola, alho, trigo, aspargos, banana e alho-poró (MUTANDA et al., 2014). Os estudos de Goto et al. (1995) indicaram a presença de quantidade significativa de oligofrutosos do tipo inulina com variados graus de polimerização, 3 a 10 unidades de frutossil, em yacon. O processo sintético voltado à produção de FOS foi realizado primeiramente em 1980 no Japão pela Meija Seika Kaisha Limited, sob o nome de Meioligo®. Posteriormente, outros países começaram a produzir e comercializar FOS em larga escala, sob diferentes marcas, tais como Nutraflora® (Estados Unidos) e Actlight® (Beghin-Meiji Industries, França), Raftilose (Bélgica) e F.O.S® (Nutramed Produtos Funcionais, Brasil) (FORTES; MUNIZ, 2009; GANAIE et al., 2014; HARTEMINK et al., 1997). Cabe destacar que tais produtos consistem em uma mistura de FOS de graus de polimerização entre 2 a 6. Todas as preparações de FOS atualmente comercializadas pelas suas propriedades prebióticas pertencem exclusivamente ao do tipo inulino-FOS e exibem baixo grau de polimerização, entre três e nove (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Estudos de Vega e Zuniga-Hansen (2011) constataram que o estoque de FOS de cadeia curta é limitado devido ao fato que as enzimas produtoras deste ingrediente não são comercialmente disponíveis. Dentre os FOS de cadeia curta, a 1-kestose é a que possui maior poder edulcorante, cujos xaropes ricos desta substância poderem ser substitutos da sacarose em dietas específicas para diabéticos (YUN, 1996).

Há relatos na literatura que a viscosidade dos FOS, quando em solução, e sua estabilidade térmica são superiores ao da sacarose, para a mesma proporção, além de serem estáveis em faixa de pH entre 4.0 e 7.0 (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

Fortes (2006) menciona que os FOS possuem ausência de cor e odor, ausência de precipitação e sensação de secura na boca, além da capacidade de melhorar o *flavour* nos alimentos e aprimorar suas características físico-química.

3.2 FOS e saúde

Hidaka et al. (1986) relatam que é bem conhecido que as bifidobactérias e os lactobacilos são classificados como bactérias benéficas intestinais, enquanto outras são desfavoráveis em termos de nutrição e saúde, tais como a *Escherichia coli* e o *Clostridium perfringens*.

Afim de minimizar a proliferação de bactérias danosas e aumentar a flora de bifidobactérias, é necessário a ingestão de carboidratos não digeríveis, conforme os estudos de Yazawa e Tamura (1982). Bifidobactérias produzem principalmente lactatos, acetatos e ácidos graxos de cadeia curtas devido ao seu metabolismo específico, além de não produzir hidrogênio e outros gases. O consumo de alimentos prebióticos ajudam na manutenção da quantidade significativa de bactérias benéficas no trato intestinal, garantindo que seus benefícios sejam conferidos à saúde.

Diversas pesquisas sugerem que o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bifidobactérias acelera o peristaltismo intestinal, combatendo a constipação, aumenta a concentração de minerais ionizados, melhorando a absorção de cálcio, magnésio e ferro e contribuem para a síntese de vitaminas do complexo B (FORTES, 2006; MARX et al., 2000; POOL-ZOBEL; SAUER, 2007).

Segundo Roberfroid et al. (1998) os alimentos prebióticos devem atender os seguintes critérios para serem classificados como tal: (i) não serem hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal superior, (ii) serem substratos seletivos para um ou um número limitado de

probióticos e (iii) serem capazes de alterar a microflora intestinal para uma composição mais ativa ou saudável.

Os FOS tem sido classificado como prebióticos por conta da sua natureza bifidogênica e por suas propriedades benéficas e auxiliares à saúde, quando consumidos em quantidade suficiente conforme recomendado, além de serem utilizados como complemento alimentar (KIM et al., 2000; MUTANDA et al., 2014).

Fortes (2006) recomenda a ingestão de 5 a 10 g/dia de FOS, garantindo o efeito bifidogênico e equilíbrio da microbiota intestinal. Ingestões acima de 30 g/dia ocasionam diversos efeitos adversos, tais como a diarreia, flatulência excessiva, pressão e ruídos intestinais elevados.

Saad (2006) define que a inulina, a oligofrutose e os FOS são compostos quimicamente semelhantes e apresentam as mesmas propriedades nutricionais, cujas similaridades são oriundas de sua estrutura baseadas em ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1) entre as unidades frutossil.

Estudos de Hidaka et al. (1986) relatam que os FOS são indigeríveis e não absorvíveis no trato intestinal superior, são seletivamente fermentados por bactérias benéficas no intestino grosso, principalmente as do gênero *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*, o que estimula o crescimento destes micro-organismos, provocando importantes efeitos na saúde.

Os FOS são classificados como fibras solúveis por não sofrerem atuação das enzimas digestivas e formarem ácidos graxos de cadeia curta por meio da fermentação seletiva das bifidobactérias presentes no cólon intestinal. Apresentam vantagens frente às fibras não-solúveis por não aumentarem a viscosidade das soluções, não se ligarem a água, não possuem efeitos espessantes, não ocasionarem diarreia quando consumidos nas doses recomendadas, não quelam minerais e possuem sabor levemente adocicado (FORTES; MUNIZ, 2009; FORTES, 2006).

FOS apresentam baixos valores de consumo calórico (2,0 kcal/g) e baixo índice glicêmico (SANTOS-MORIANO et al., 2015), já que dificilmente são hidrolisados pelas enzimas digestivas devido a configuração das ligações entre os grupos frutossil, compreendendo assim um alimento seguro para diabéticos por não terem efeito no teor de glicose sanguíneo do tipo 2 (MABEL et al., 2008; SAULNIER et al., 2007; YUN et al., 1996). Li et al. (2013) menciona ainda que existem evidências de melhoras cognitivas e efeitos protetivos ao cérebro relacionadas ao consumo de FOS.

São largamente utilizados na indústria alimentícia como edulcorantes e devido as suas propriedades prebióticas, além de serem cerca de 0,4 a 0,6 vezes tão doce quanto a sacarose,

propriedade amplamente desejada na indústria, pois evita a sensação demasiadamente doce ao paladar de algumas preparações que a sacarose seria restrita devido à sua elevada doçura (SPIEGEL et al., 1994).

Como não são consumidos pelos *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* entre outros, não originam ácidos e β -glucano que são responsáveis pela formação de cáries dentais, sendo assim os FOS classificados como não cariogênicos. (ANDERSSON et al., 1999). Rivero-Urgel e Santamaria-Orleans (2001) constataram que o consumo de FOS provoca o decréscimo de teores de colesterol, triglicerídeos e fosfolípidios séricos além da diminuição da pressão sanguínea diastólica.

O consumo de FOS é associado a redução de risco ao câncer de cólon do intestino, diminuição de doenças cardiovasculares e obesidade. Estudos apontam que os FOS são capazes de modular, não especificamente, os marcadores de risco para o câncer de cólon em células de humanos através da redução da exposição aos fatores de risco e supressão tumoral das células de sobrevivência (FORTES, 2006; MARX et al., 2000; POOL-ZOBEL e SAUER, 2007).

Fortes e Muniz (2009) estimam um consumo per capita de FOS de 2 a 12 g/dia na Holanda, 7 a 12 g/dia na Espanha, 5 a 8 g/dia na Bélgica, 1 a 4 g/dia nos Estados Unidos. O Japão é o maior consumidor de FOS, com consumo médio de 13,7 mg/(kg.dia). Para o Brasil, tais dados não estão disponíveis.

3.3 Aplicações dos FOS

Segundo a Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999, “Os frutooligossacarídeos (FOS) contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

A ANVISA (1999) recomenda que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido. Se o produto for apresentado na forma de comprimidos, cápsulas ou tabletes, os requisitos acima devem ser atendidos na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, em conjunto da seguinte informação em destaque no rótulo: “O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos”. A quantidade de FOS deve ser declarada na tabela de informação nutricional abaixo de fibras alimentares. O uso de FOS não

deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante.

Os alimentos cujas formulações incluem FOS como fonte edulcorante, podem incluir no rótulo “açúcar reduzido”, “sem adição de açúcar”, “calorias reduzidas”, produtos “sem açúcar”, produtos “diet” e “produtos funcionais”, se estes promoverem efeito adicional nas áreas de prebióticos, simbióticos e fibras alimentares (FORTES, 2006; PASSOS; PARK, 2003; ROBERFROID et al., 1998)

Os FOS são altamente higroscópicos e a sua viscosidade quando em soluções é relativamente maior que aquelas de sacarose quando em mesma concentração, além de apresentarem maior estabilidade térmica. Estas propriedades os tornam altamente visados para a produção produtos como iogurtes, bebidas funcionais como sucos e néctares frescos, sorvetes, biscoitos, produtos de confeitaria, molhos, entre outros (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; SILVA, 2009; FORTES, 2006; PASSOS; PARK, 2003.).

Fortes (2006) verifica que os FOS podem ser utilizados como suplementos alimentares, aumentando o conteúdo de fibras nos alimentos, sem contribuir com o aumento da viscosidade, ou alterar indesejavelmente as características organolépticas dos mesmos. Silva (2009) cita a utilização de FOS em balas mastigáveis infantis, em barras de cereais e em produtos alimentares para animais com os mesmos intuitos prebióticos.

3.4 Síntese enzimática de FOS

Wang (2015) relata que atualmente os processos enzimáticos são preferidos na indústria de alimentos para a produção dos mais importantes oligossacarídeos, haja vista que etapas envolvendo estereoseletividade e regioseletividade das enzimas são necessárias para a síntese de oligossacarídeos estruturalmente bem definidos.

Os estudos de Ning et al. (2010) diagnosticam que diversas novas enzimas microbianas produtoras de oligossacarídeos específicos estão sendo descobertas desde 1970. A utilização destas novas enzimas torna possível a produção, em escala industrial, de vários oligossacarídeos como a glicosilacarose, frutooligossacarídeos, maltoligossacarídeos, isomaltoligossacarídeos, galactoligossacarídeos, xiloligossacarídeos, isomaltulose, entre outros.

As enzimas utilizadas para a síntese de FOS são as inulinases (EC 3.2.1.7), enzimas que hidrolisam a inulina, a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), que transferem grupos frutossil para moléculas de sacarose e a β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), que hidrolisa a

sacarose em glicose e frutose, sendo todas estas provenientes de fontes microbianas ou vegetais (GANAIE et al., 2014).

Conforme listado por Ganaie et al. (2014) e Antošová e Polakovič (2001), diversos autores já demonstraram que enzimas presentes em diversas plantas são responsáveis por atividades de transfrutossilagem e hidrolíticas via mecanismos específicos, o que torna a sua nomenclatura mais direta. Contudo, a nomenclatura das enzimas microbianas produtoras de FOS ainda causam controvérsias no meio acadêmico. Alguns autores utilizam o termo frutossiltransferase e outros designam tais enzimas como β -frutofuranosidase.

A enzima produtora de FOS é usualmente classificada como FFase, provavelmente devido ao fato que foi constatado atividade de transfrutossilagem pela invertase quando o meio reacional é composto por alta concentração de sacarose (CHIEN et al., 2001; YUN, 1996). Muitos pesquisadores atualmente a classificam como frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) para enfatizar a produção de FOS pela atividade de transfrutossilagem e a distinguir da nomenclatura dada a enzimas hidrolíticas.

Nota-se que não existe consenso em relação a nomenclatura correta das enzimas envolvidas na produção de FOS. Oliveira (2007) e Ghazi et al. (2005) atestam a dificuldade de definição da nomenclatura, já que esta muda de acordo com a fonte da enzima.

Nos trabalhos de L'Hocine et al. (2000) discute-se amplamente sobre as denominações FTase e a FFase, sendo que após a separação e purificação das duas enzimas produzidas por *Aspergillus niger*, estes autores determinaram que a nomenclatura correta da enzima responsável pela transferência de grupos frutossil é FTase.

Antošová e Polakovič (2001) definem de forma clara que somente aquelas enzimas que possuem uma razão significativa transglicosilação/hidrólise podem ser consideradas transglicosidases. FTases são então transglicosidases que transferem o resíduo frutossil da sacarose, obtendo tanto FOS, quanto outros polímeros, como frutanos, que incluem a inulina ou levanos.

Ghazi et al. (2006) esclarecem que independente da fonte de origem e da denominação, tanto a FTase, quanto a FFase apresentam tanto a atividade de transfrutossilagem quanto a atividade de hidrólise, em graus diferentes, mas que esta última se limita a produção de FOS ao uso de altas concentrações de sacarose. Tal inferência é baseada nos trabalhos de HIDAHA et al. (1988) e JUNG et al. (1989), que constataram para a FTase produzida por *Aspergillus niger* que, a formação de FOS em altas concentrações de sacarose é favorecida, porém a baixas concentrações de sacarose a ação hidrolítica é predominante.

3.4.1 Reação e atividade de transfrutossilção (A_t)

As transferases catalisam a transferência de um átomo ou grupo de átomos entre duas moléculas, mas excluindo as transferências entre outros grupos, tais como a água ou oxigênio, que caracteriza uma hidrólise ou oxi-redução. (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002;)

Segundo o banco de dados ExplorEnz da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2016), a reação promovida pela FTase ou inolosacarase (EC 2.4.1.9) é a transferência de grupos frutossil, conforme esquematizado na Figura 2.

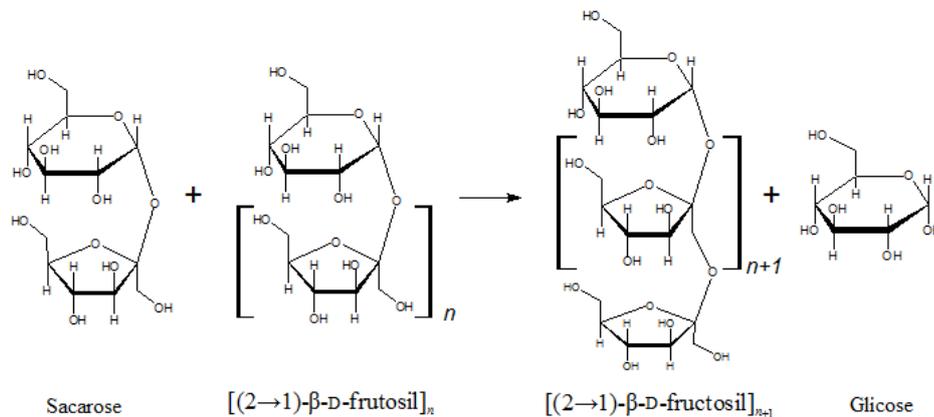


Figura 2 - Esquema da reação de transfrutossilção.

Fonte: do autor.

A reação de transfrutossilção é uma classe dentre as reações de transglicosilação, que consistem na hidrólise das ligações glicosídicas. Atuam sobre a sacarose ao clivar as ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1), que liga a metade frutossil à metade glicosil da molécula, e transfere o grupo frutossil de um doador ativado para uma molécula aceptora apropriada, como a sacarose ou outras moléculas de FOS, liberando a glicose como um subproduto (ANTOSOVÁ et al., 2008; JUNG et al., 1989; YUN et al., 1996).

Ghazi et al. (2006) e Feng et al (2005) mencionam que as transglicosidases são enzimas que possuem a função normal de transferir o resíduo de glicosil ou frutossil para outro açúcar acceptor (reação de transferência), assim como também elas também podem utilizar a água como acceptor nucleófilo, do intermediário glicosil-enzima (reação de hidrólise).

A transglicosilação é usualmente um processo cineticamente controlado, já que os FOS de cadeia curta obtidos são potenciais substratos da reação, além de serem substratos para a ação da β -frutofuranosidase, levando a sua possível degradação (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MONSAN; PAUL, 1995).

As definições de atividade de transfrutossilação (A_t) são, assim como as duas denominações das enzimas que possuem atividade de transfrutossilação, conflitantes. Ottoni et al. (2012) e Cuervo-Fernandez et al. (2007) definem esta como a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto. Desta forma, a concentração de FOS utilizada por estes autores inclui teores de 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose. Ganaie e Gupta (2014) definem como atividade de transfrutossilação a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto.

Outros estudos propõem que a atividade de transfrutossilação é a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto (CHEN e LIU, 1996; HAYASHI et al., 1990; KURAKAKE et al., 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011). Assim, a concentração de frutose transferida é obtida indiretamente pelo balanço de massa dado na Equação (1):

$$[FOS]=[G]-[F] = 2[G]-[ART] \quad (1)$$

em que [ART], [F], [G] e [FOS] representam as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e frutooligossacarídeos, respectivamente, expressas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.4.2 Reação e atividade hidrolítica (A_h)

A reação de hidrólise da sacarose ocorre de variadas formas, seja esta promovida via rota enzimática ou via ácidos diluídos, provocando a liberação de glicose e frutose, monossacarídeos constituintes de sua estrutura. Esta reação, conhecida como inversão da sacarose é muito aplicada na indústria alimentícia (FELTRE, 2005). A hidrólise da sacarose ou de FOS está ilustrada na Figura 3.

As hidrolases promovem as reações catalíticas de hidrólise e sua reversão. A enzima associada à hidrólise da sacarose e dos FOS é a β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26), comumente conhecida como invertase (SHULER, 2002).

A atividade hidrolítica (A_h) relaciona a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um dos produtos da hidrólise por minuto. Diversos autores definem esta atividade como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de frutose por minuto (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012). Ganaie e Gupta (2014) definem

como atividade hidrolítica a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto.

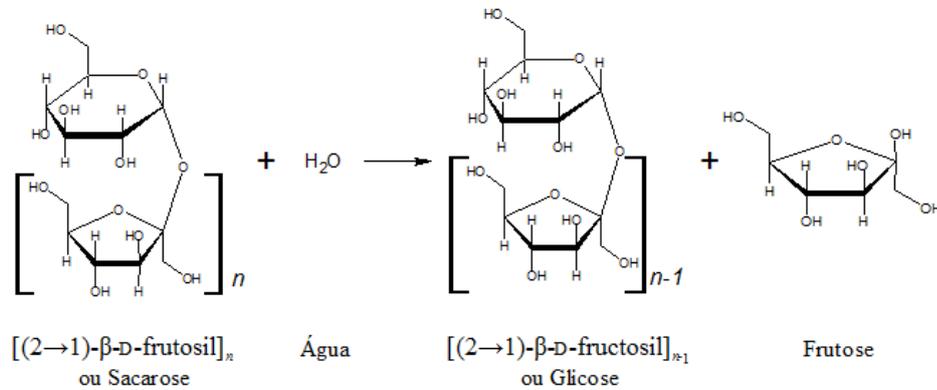


Figura 3 - Esquema da reação de hidrólise de sacarose ou FOS.

Fonte: do autor.

3.4.3 Razão A_t/A_h

Cuervo-Fernandez (2007) e Hidaka et al. (1988) determinam que os valores da razão A_t/A_h é um parâmetro importante a ser considerado quando o objetivo é diagnosticar a produção de FOS por diferentes cepas. Esta razão indica a predominância da atividade de transfrutossilagem sobre a atividade hidrolítica, já que a hidrólise compete concomitantemente com a transfrutossilagem, sendo preferível, para a síntese eficiente de FOS, elevados valores de A_t/A_h associados a alta produtividade enzimática (OLIVEIRA, 2007).

3.4.4 Inulinasas microbianas

As inulinasas microbianas são preferidas para a produção industrial FOS por sua maior estabilidade térmica, serem ativas em condições suaves e em uma ampla faixa de pH. A hidrólise da inulina pode ser conseguida pelo uso de exoinulinase (2,1- β -D-frutano frutohidrolase, EC 3.2.1.80), que sucessivamente cliva as frutoses terminais da inulina, ou endoinulinase (2,1- β -D-frutano-frutano hidrolase, EC 3.2.1.7) que hidrolisa as ligações internas da cadeia de inulina liberando intermediários como a F_3 , F_4 ou F_5 . A nomenclatura deve-se ao fato de romper das ligações 2 \rightarrow 1 terminais ou internas da cadeia de inulina, podendo atuar isoladamente ou sinergicamente (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MUTANDA et al., 2014).

3.4.5 β -frutofuranosidase (FFase)

A nomenclatura sistemática proposta pela IUBMB (2016) para a β -frutofuranosidase é β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, sendo também comumente nomeada como invertase, sacarase, glicosacarase, β -h-frutosidase, β -frutosidase, invertina, maxinvert L 1000, frutosilinvertase invertase alcalina, invertase ácida e FFase. O banco de dados BRENDA (2016) lista os micro-organismos produtores de β -frutofuranosidase, sendo os principais listados na Tabela 1.

A FFase é uma enzima que hidrolisa o terminal não-redutor de resíduos β -D-frutofuranosídeos, como sacarose em glicose e frutose, porém dependendo da origem, pode exibir uma elevada atividade de transfrutossilacção em condições reacionais apropriadas. A utilização desta enzima provê a produção de FOS por duas formas: a hidrólise reversa e a transglicosilacção (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Tabela 1 – Principais micro-organismos produtores de β -frutofuranosidase EC 3.2.1.26

Micro-organismos		
<i>Agave tequilana</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Phyllostachys edulis</i>
<i>Allium cepa</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>
<i>A. globiformis</i> IFO 3062	<i>Corynebacterium murisepticum</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1100	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> IPT-329	<i>Lilium auratum</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Lilium longiflorum</i>	<i>Thermotoga neapolitana</i>
<i>B. adolescentis</i> G1	<i>Neurospora sitophila</i>	<i>Vitis labrusca</i> x <i>Vitis vinifera</i>
<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	<i>Nicotiana glauca</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Woodfordia fruticosa</i>
<i>B. longum infantis</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. c.v. BY-2	<i>X. dendrorhous</i>
<i>Citrus sinensis</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

Fonte: adaptado de BRENDA, 2016

A hidrólise reversa é um processo na qual a reação de equilíbrio é deslocada, a partir da hidrólise da sacarose, para a síntese de oligossacarídeos pelo ajuste das condições reacionais. Na primeira etapa da reação, um complexo ativado enzima-doador, sendo o doador um composto com um grupo frutossil, é formado, e prontamente reage com um grupo hidroxila de um aceptor. O aceptor pode ser tanto a água, que promove a hidrólise, quanto a sacarose, que direciona a reação no sentido da hidrólise reversa. A quantia de FOS produzidas por este mecanismo depende da constante de equilíbrio das reações envolvidas, assim, o aumento da

concentração de substrato e conseqüente redução de atividade de água, promove a obtenção de altos rendimentos de FOS (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Andersen (1967) confirmou a hipótese que a FFase proveniente de leveduras é capaz de sintetizar FOS pelo provável mecanismo de hidrólise reversa, utilizando um preparado enzimático de alta pureza em uma solução de frutose na qual esta apresentou o comportamento tanto de doador, formando um complexo enzima-frutose, quanto de acceptor, simultaneamente, tal como o mecanismo de hidrólise reversa da sacarose menciona.

Os estudos de Somiari e Bielecki (1995) apresentaram baixo rendimento de produção de FOS pela invertase mesmo em soluções com altas concentrações de sacarose, permitindo confirmar esta hipótese. Já Fujita et al. (1990) reportam que a β -frutofuranosidase oriundo de *Arthobacter sp.* K-1 mostrou atividade de transfrutossilacção para diversos aceptores formando frutossilxilosídeo e lactossilacarose.

3.4.6 Frutossiltransferase (FTase)

A nomenclatura sistemática da FTase proposta pela IUBMB (2016) é sacarose:(2 \rightarrow 1)- β -D-frutano 1- β -D-frutossiltransferase, sendo também aceites sacarose:1-frutossiltransferase e sacarose:2,1- β -D-frutano 1- β -D-frutossiltransferase, comumente chamada FTase. Sua principal função é converter a sacarose em inulino-FOS e D-glicose.

Segundo os registros da IUBMB (2016), a primeira notificação desta enzima foi realizada por Bacon e Edelman (1950) e a catalogação como EC foi realizada em 1961. Segundo o banco de dados BRENDA (2016), foi reportada a produção de FTase pelos micro-organismos citados na Tabela 2.

A FTase catalisa a transferência de um grupo frutossil para uma molécula de sacarose ou um frutoligossacarídeo quando o FOS com uma cadeia maior já está formado. A FTase apresenta baixa afinidade pela água como acceptor, o que significa que a atividade hidrolítica desta enzima é baixa. Os rendimentos de obtenção de FOS preparados a partir das FTases são geralmente altas, mesmo em soluções diluídas de substrato (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Foram reportados diversos substratos sobre os quais a FTase possui ação, conforme lista-se na Tabela 3.

Antošová e Polakovič (2001) diagnosticam que a principal diferença entre a FTase e a FFase é que a primeira possui alta atividade de transfrutossilacção, com alta afinidade para a

sacarose ou FOS como aceptores de grupos frutossil, sendo esta afinidade menor para com a água. Devido a própria natureza destas enzimas, que possuem as atividades hidrolíticas e de transfrutossilção, é difícil separá-las e classificá-las, já que ambas atividades podem ocorrer em uma mesma enzima de uma mesma fonte. Contudo, estudos como os de L'Hocine et al. (2000) e Hayashi et al. (1990) isolaram tais enzimas, que apresentaram apenas atividades hidrolíticas, no caso da β -frutofuranosidase, e de transferência no caso da FTase.

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de FTase EC 2.4.1.9

Micro-organismo	
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus japonicus FCL 119T</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121
<i>Aspergillus japonicus JN19</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i> TMW1.106
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> CW2.
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF 202	<i>Leuconostoc citreum</i> CW28
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Myceliophthora heterothallica</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-6
<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Paenibacillus macerans</i> EG-7
<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Penicillium citrinum</i> FERM P ¹ 5944
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	<i>Penicillium purpurogenum</i>

Fonte: adaptado de BRENDA, 2016

Tabela 3 - Principais substratos alvo da FTase e respectivos produtos.

Substratos	Produtos
3 sacarose + sacarose	3 alfa-D-glicose + (2,1-beta-D-frutossil) _{n+1}
sacarose + (2,1-beta-D-frutossil) _n	alfa-D-glicose + (2,1-beta-D-frutossil) _{n+1}
sacarose + H ₂ O	alfa-D-glicose + beta-D-frutose
sacarose + sacarose	kestose + nistose + frutooligossacarídeos
sacarose + sacarose	[(beta-D-frutose-(2 ⁻¹)) _n]-alfa-D-glicose + alfa-D-glicose
sacarose + [(2→1)-beta-D-frutossil] _n	glicose + [(2→1)-beta-D-frutossil] _{n+1}
sacarose + [(beta-D-Fruf-(2 ⁻¹)) _n]-alfa-D-Glup	alfa-D-glicose + [(beta-D-Fruf-(2 ⁻¹)) _{n+1}]-alfa-D-Glup

Fonte: adaptado de BRENDA, 2016

3.4.7 Fontes de enzimas produtoras de FOS

Uma ampla gama de inulinases e FTases estão envolvidas na formação de oligossacarídeos, sendo os principais FOS, 1-kestose, nistose e fructofuranosilnistose

sintetizados por diversas enzimas de fontes microbianas e vegetais. Para propósitos industriais, é tecnicamente preferível as enzimas microbianas, que em geral são produzidas por fermentação submersa (SmF) ou fermentação em fase sólida (SSF) (MUTANDA et al., 2014).

Enzimas com atividade de transfrutossilacção estão presentes em diversas plantas superiores, como os aspargos, alcachofra de Jerusalém, chicória, cebola, batata doce, além de serem produzidas por diversos micro-organismos. Dentre as principais fontes vegetais estão os gêneros *Agave*, *Asparagus*, *Allium*, *Cichorium*, *Crinum*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Lycoris*, *Polymia*, *Taraxacum* (GOTO et al., 1995; YUN, 1996). A quantidade de enzimas produzidas por plantas é mínima e limitada por condições sazonais, assim a produção industrial de FOS depende principalmente de enzimas microbianas (ANTOŠOVÁ e POLAKOVIČ, 2001; HERNALSTEENS, 2006).

Na literatura é reportado por diversos autores que os micro-organismos dos gêneros *Aureobasidium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Claviceps*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Lactobacillus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Scopulariopsis*, *Sporotrichum*, *Streptococcus*, *Xanthophyllomyces* e *Zymomonas* possuem espécies e cepas capazes produzir enzimas com atividade de transfrutossilacção (CHEN et al., 2014; GANAIE et al., 2014; MUTANDA et al., 2014; YUN, 1996).

Quando preparados via rota enzimática, são obtidas misturas constituídas por FOS de diversos comprimentos de cadeia, uma fração de glicose e frutose além de uma quantidade significativa de sacarose que porventura não foi utilizada durante a reação enzimática. Estima-se que estes subprodutos chegam a um total de 40-45% do total de açúcar em preparos comerciais de FOS (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001). Yun (1996) cogita que o FOS comercial pode conter altos níveis de glicose, frutose e sacarose que são liberados como subprodutos e podem atingir 500g/kg de massado preparado de FOS.

3.4.8 Mecanismo de reação enzimática da FFase e FTase

A rota de reação enzimática para a produção de FOS é descrita pelo modelo proposto por Lee e Shinohara (2001), ilustrado na Figura 4. Além da reação de síntese e transferência, é conhecido que a reação de hidrólise ocorre simultaneamente.

Em plantas, FOS são produzidos a partir da sacarose por meio da atuação sinérgica de duas FTases: a sacarose:sacarose 1^F-β-D-frutossiltransferase (1^F-SST, E.C. 2.4.1.99) e a 1,2-β-D-frutano:1,2-β-D-frutano 1^F-β-D-frutossiltransferase (1^F-FFT, E.C. 2.4.1.100). Estas duas

enzimas, em geral, são produzidas durante os estágios de acúmulo de frutanos em meses frios. A 1^F -SST promove a transferência irreversível das unidades de frutossil a partir de uma sacarose doadora para uma sacarose aceptora, formando a 1-kestose (GF_2) e glicose. Já a 1^F -FFT catalisa a elongação da cadeia de FOS por meio da ação sobre moléculas com pelo menos duas unidades frutossil na cadeia, em que ambos são doadores e receptores (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

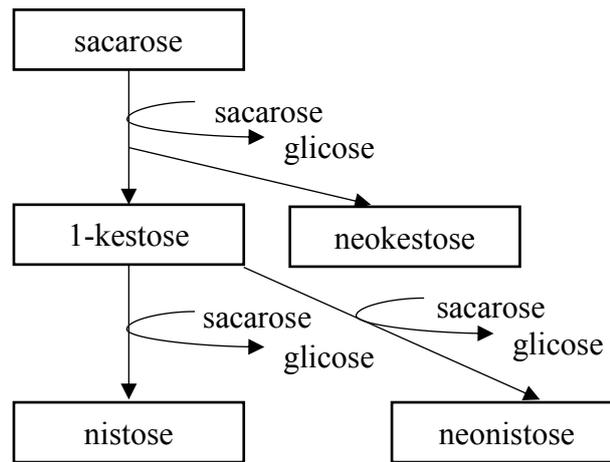


Figura 4 - Rota esquemática de produção de FOS.
Fonte: Adaptado de LEE e SHINOHARA, 2001.

Segundo Cairns (1993), a síntese de longas cadeias de frutanos em algumas plantas não é inibida pela sacarose, e uma elevada concentração enzimática é requerida para que não ocorra tal inibição.

Em micro-organismos, ocorre a presença de apenas uma enzima responsável pela produção de FOS, a FTase ou a FFase, que catalisa a transferência de resíduos de frutossil em uma série de reações desproporcionais onde uma molécula de sacarose atua como doadora e outra atua como aceptora, acarretando na formação de uma mistura de FOS de diferentes tamanhos de cadeia, além de glicose como subproduto. FTases microbianas, diferentemente daquelas produzidas em vegetais, possuem ambas atividades de hidrólise e transfrutossilção (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; MUTANDA et al., 2014).

Estas enzimas sintetizam FOS com diferentes tipos de ligações glicosídicas, cuja variação no rendimento depende diretamente da concentração inicial da sacarose na mistura reacional (MUTANDA et al., 2014).

A posição das ligações glicosídicas entre os resíduos de frutossil na cadeia oligomérica depende da regioseletividade da FTase. A regioseletividade é uma propriedade característica da enzima em ligar um resíduo frutossil em uma exata posição do acceptor. A 1^F -FTase catalisa a

transferência dos resíduos frutossil para os grupos primários de hidroxila do terminal frutofuranosídico em ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1). Algumas plantas e micro-organismos produzem ^6F - e ^6G -FTase. A ^6F -frutossiltransferase produz FOS do tipo levano com ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6) entre os grupos frutossil. Já as ^6G -frutossiltransferases produzem os neo-FOS, que são oligossacarídeos ramificados em que metade frutossil liga-se diretamente à metade glicosil da sacarose por meio de ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6) (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

A β -frutofuranosidase oriunda de fungos e leveduras pode sintetizar oligo e heterossacarídeos pela transferência de resíduos de frutossil da sacarose para aceptores adequados (BACON; EDELMAN, 1950). Este mecanismo de transferência reversível foi demonstrado por HESTRIN et al. (1955) na qual grupamentos frutofuranosídicos de um aldósídeo, que servem como doador foram transferidos para o oxigênio do carbono anomérico de um outro aldósídeo que atua comoceptor, em um sistema reacional enzimático contendo levansacarase.

3.5 Produção de FOS

A produção industrial de FOS é realizado através de dois processos distintos. O primeiro inclui um procedimento fermentativo composto de duas etapas: a primeira consiste em produzir enzimas por fermentação, sendo estas aplicadas, posteriormente, de forma livre ou imobilizada na etapa reacional. Já no processo de apenas uma etapa, utiliza-se células completas de um determinado micro-organismo, seja este em suspensão ou imobilizado, sendo os FOS produzidos concomitantemente com processo fermentativo (WANG, 2015).

A produção de biomassa é limitada pelos requerimentos do micro-organismo, porém as condições ótimas de crescimento podem não ser as mesmas condições ótimas de produção dos FOS. Por este motivo, processos que consistem de duas etapas são preferidos (HERNALSTEEN, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Os estudos pioneiros de Hidaka et al. (1988) constataram que a produção comercial de FOS, deu-se primeiramente pela ação de transferases produzidas por *Aspergillus niger* ou *Aureobasidium pullulans*. Tal síntese já é favorecida naturalmente pelos altos valores da razão A_v/A_h , característica específica da enzima produzida por cada micro-organismo, porém também dependiam do ajuste fino nas condições reacionais, tal como o pH, temperatura e tempo de reação, afim de favorecer atividade de transfrutossilção frente a atividade hidrolítica e por consequência, a produção de um FOS específico ou uma mistura de oligômeros de frutose.

Parâmetros como pH, temperatura, concentração de substrato, estabilidade frente ao pH e temperatura e os parâmetros cinéticos são em geral estudados para obter melhores condições reacionais em larga escala, e assim a enzima poder ser utilizada industrialmente sem ou com mínimos ajustes do meio para que a reação ocorra (HAYASHI et al., 1990; HERNALSTEEN, 2006; OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2009; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

O conhecimento de cada efeito destes parâmetros é usualmente estudado, contudo Vega e Zúniga-Hansen (2011) diagnosticaram que as interações entre essas condições reacionais geralmente não são avaliadas, além de que a otimização da produção de xaropes contendo alto conteúdo de FOS com um grau de polimerização específico e sua produtividade volumétrica são negligenciados.

Elevada concentração de sacarose é recomendada para a obtenção de altas quantias de FOS no xarope. Os valores de concentração de sacarose variam entre 500 a 850 g.L⁻¹ para rendimento médio entre 50 a 60 % de FOS da concentração total de sacarose inicial. A concentração elevada de substrato deve-se ao fato de aumentar a proporção da atividade de transfrutossilação em relação a atividade hidrolítica quando ocorre a produção de FFases simultaneamente com as FTases (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001). Contudo, devido a interações entre a concentração de substrato e o pH do meio reacional, estes limites de concentração são variáveis, conforme atestado por Katapodis et al. (2004) em seus estudos de síntese de FOS via FFase oriunda de *Sporotrichum thermophile* ATCC 28811, cujo alto rendimento de obtenção de FOS ocorreu em pH 6,0 e concentração de substrato de 250 g.L⁻¹.

A temperatura operacional de produção de FOS pelo uso de FTase microbiana geralmente varia entre 50 a 60 °C. Nesta faixa de temperatura a viscosidade da solução altamente concentrada de sacarose é baixa o suficiente para não interferir na reação, além de esta temperatura influenciar favoravelmente na taxa de reação enzimática (CUERVO-FERNANDEZ, et al., 2007; CUERVO-FERNANDEZ, et al., 2004).

Cuervo-Fernandez et al. (2004) observam que o pH ótimo depende da fonte enzimática. FTases isoladas de alcachofras de Jerusalém possuem pH ótimo variando entre 3,5 e 5. Já aquelas isoladas a partir de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicus* e *Scopulariopsis brevicaulis* requerem pH básico na faixa de 8-9. Contudo, a maioria das FTases possuem faixa ótima de pH entre 5 a 6,5.

Os estudos de Kurakake et al. (1996) reportam a mudança da ação de FFase oriunda de *Aspergillus oryzae* sobre a sacarose de acordo com o pH do meio. A atividade de transfrutossilação foi favorecida em faixa de pH alcalino e a hidrolítica em faixas mais ácidas,

sendo este fenômeno atribuído a mudanças de afinidade do sítio ativo pela sacarose devido à sua conformação estrutural decorrente da mudança de pH do meio reacional.

Vega e Zuniga-Hansen (2011) mencionam que altas temperaturas e altas concentrações de substrato no meio reacional provocam aumento da taxa de transfrutossilacção, o que leva a maior conversão de 1-kestose em nistose. Assim, o ideal é o ajuste entre as condições reacionais de acordo com o requerimento de cada produto final desejado.

A morfologia do micro-organismo tem sido considerada em processos de produção de FOS, principalmente em processos de apenas uma etapa. Quando fungos filamentosos crescem em meio submerso, é comum a formação de pellets redondos, que consistem em massas compactas de hifas que possuem sua morfologia modificada ao longo de seu crescimento. A formação de pellets em âmbito industrial é benéfica, visto que os filamentos podem enroscar e danificar as lâminas dos agitadores e geralmente bloquear os aspersores. A formação de pellets facilita a recuperação e purificação das FTases produzidas além de poderem ser utilizados em um novo ciclo de fermentação, produzindo FTase extracelular (SANGEETHA et al., 2005).

3.6 Inibição enzimática

Deseja-se para aplicações industriais enzimas com alta resistência às condições reacionais, como íons metálicos, detergentes, solventes orgânicos e até mesmo os substratos e produtos oriundos da própria reação (SHULER, 2002).

Estudos de Duan et al. (1994) e Jung et al. (1989) relatam que a produção de FOS pela ação de FTase é inibida competitivamente pela ação da glicose formada como subproduto, impedindo consideráveis quantias de sacarose de serem convertidas. Assim, a maioria dos xaropes de FOS comercializados são uma mistura constituída de 50-60 % de FOS, 25-30 % de glicose, 10-15 % de sacarose não convertida e uma pequena quantia de frutose.

A obtenção de FOS de alta pureza é vinculada ao uso de sistemas reacionais contendo mistura de FTases e glicose oxidase, na qual a glicose formada como subproduto é convertida em ácido glucônico pela ação de glicose oxidase ou glicose dehidrogenase. O ácido glucônico é então precipitado com carbonato de cálcio e removido da mistura reacional (SHEU et al., 2013).

A sensibilidade de várias FTases a cátions metálicos tais como Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} e Ag^{2+} , conhecidos por serem inibidores não competitivos, dependem principalmente da fonte enzimática. Antošová e Polakovič (2001) relatam que possivelmente tal inibição deve-se

à existência de grupos tiol localizados no sítio ativo ou nas suas proximidades. Hirayama et al. (1988) constata que apenas o cátion Hg^{2+} inibiu a atividade da β -frutofuranosidase oriunda de *Aspergillus niger* ATCC 20611.

3.7 Propriedades físico-químicas da FTase e FFase

FTases e FFases microbianas e vegetais são glicoproteínas contendo cerca de 20-50% em massa de carboidratos, composta principalmente por oligômeros de glicose e manose em suas moléculas, o que resulta em grande afinidade perante a concanavalina A (ConA). Esta afinidade é útil para etapas de purificação via cromatografia, conforme realizado nos estudos de Lüscher et al. (2000), Rehm et al. (1998), e St. John et al. (1997).

A deglicosilação (reação enzimática de remoção de resíduos glicosídicos) provoca um aumento na susceptibilidade das enzimas frente a ação de inibidores orgânicos e inorgânicos, porém não tem influência na atividade e especificidade das FTases (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

A massa molecular relativa (M_r), número de monômeros na molécula proteica ativa e grau de glicosilação das FTases e FFases dependem da fonte enzimática. As FTases oriundas de plantas possuem M_r em geral menor que as microbianas, variando entre 60-85 kDa. São constituídas de duas subunidades que possuem por volta de 50-60 kDa e 22-27 kDa respectivamente (KOOPS, 1996; LUSCHER, 1996).

As FTases e FFases de origem microbiana são constituídas de duas, três, quatro ou seis unidades monoméricas, com M_r entre 90 a 125 kDa, resultando enzimas com M_r variante entre 180-600 kDa. Contudo, Kurakake et al. (1996) e Chang et al. (1994) isolaram FFase a partir de *Aspergillus oryzae*, sendo esta constituída por um monômero com M_r de 87-89 kDa.

3.8 Cinética enzimática

As enzimas são poderosos catalisadores de fontes biológicas. Elas mediam todas as reações de síntese ou degradação realizados por organismos vivos (SHULER, 2002). As principais vantagens das enzimas sobre os catalisadores químicos são a especificidade e a seletividade não somente para reações particulares, mas também para discriminação de partes semelhantes de moléculas (regioseletividade) ou isômeros ópticos (estereoespecificidade) (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

Suas reações provocam a formação de poucos subprodutos indesejados, com alta produtividade mesmo em condições moderadas de temperatura, pressão e pH. Como desvantagem, temos que as enzimas possuem natureza instável quando removidas de seu ambiente natural, o que acarreta na não realização correta de suas funções, além de altos custos envolvidos na purificação da mesma (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

A função das enzimas é formar um complexo substrato-enzima que propicia um novo mecanismo de reação, requisitando menor energia de ativação (E_a) que a reação não catalisada. Os possíveis mecanismos envolvidos na redução da E_a são: orientação correta do substrato para reagir, aumento da tensão dos reagentes, formação de uma via alternativa reativa e a catalisação de grupos iônicos (CHAPLIN; BUCKE, 1990; FELTRE, 2005).

3.8.1 Aspectos gerais da cinética enzimática

Segundo Oliveira (2007), a cinética de grande número de enzimas pode ser predita pelo modelo matemático de Michaelis-Menten. Este modelo não considera a reversibilidade do produto ao substrato, pois admite-se uma das seguintes hipóteses: é considerado que o início da reação há pouca ou nenhuma quantidade de produto ou a reação é eficazmente irreversível.

O modelo de Michaelis-Menten descreve que a formação do complexo enzima-substrato ([ES]) é de 1° ordem em relação à enzima e de 1° ordem em relação ao substrato. A etapa de formação e dissociação do [ES] é extremamente rápida, aproximando-se de um estado estacionário, e que o equilíbrio perante a formação do [ES] é atingido tão rapidamente que a concentração de sítios ativos ocupados é muito baixo, concluindo-se que [ES] é irrelevante (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002). O modelo de Michaelis-Menten é dado pela Equação (2):

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \quad (2)$$

em que K_m é a constante de Michaelis-Menten que representa a medida de afinidade da enzima para com o substrato ([S]). O valor da velocidade máxima (V_{max}) é a taxa máxima de reação que ocorre quando a enzima está completamente saturada com o substrato e varia de acordo com as condições de temperatura e pH.

Segundo Oliveira (2007), neste modelo encaixam-se as reações onde há saturação a um determinado valor de substrato oferecido, ou seja, não ocorre incremento na velocidade de reação independente do aumento de substrato.

Diversas enzimas não apresentam a curva de velocidade hiperbólica como as verificadas pelo modelo de Michaelis-Menten, mas sim uma curva do tipo sigmoide, que pode representar uma ligação cooperativa do substrato ao sítio catalítico da enzima. Isso significa que a união do substrato ao sítio catalítico influencia na união das moléculas de substrato posteriores. Este comportamento é mais comum em enzimas multiméricas, ou seja, apresentam múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos. Este tipo de enzima é denominado alostérica (WEISS, 1997).

A cooperatividade pode ser positiva, que ocorre quando a primeira molécula do substrato incrementa a afinidade dos demais sítios ativos, o que acarreta em alta sensibilidade à concentração de substrato, e com isso a atividade pode ser alterada mesmo em intervalos estreitos de concentração. Já a cooperatividade negativa é ocasionada quando a primeira molécula do substrato reduz tal afinidade, tornando a enzima insensível a pequenas mudanças de concentração de substrato (WEISS, 1997).

O modelo de Hill descreve quantitativamente grau de cooperatividade em cinéticas não michaelianas. Este é descrito pela Equação (3):

$$V = \frac{V_{max}[S]^n}{[S]^n + (K_{0,5})^n} \quad (3)$$

em que $K_{0,5}$ é a concentração de substrato que aumenta velocidade máxima de reação em 50 % da velocidade máxima, que representa a medida de afinidade da enzima para com o substrato ([S]) (WEISS, 1997).

O coeficiente de Hill (n) proporciona uma medida da cooperatividade da ligação do substrato à enzima. Se $n > 1$, a reação exibe cooperatividade positiva em relação à ligação do substrato à proteína. Um valor maior que 1 para o coeficiente de Hill também sugere que há mais do que um sítio de ligação de substrato na proteína estudada. Isto pode resultar da presença de dois ou mais sítios de ligação de substrato num monómero de proteína. Poderia também surgir da montagem de subunidades múltiplas de uma proteína, cada uma com um único sítio de ligação de substrato. A cooperatividade positiva refere-se ao fato de a ligação de um substrato facilitar a ligação de outro substrato à proteína. Se $n = 1$, a equação de Hill é reduzida à equação de Michaelis-Menten. Quando $n = 1$, não há cooperatividade com respeito à ligação

do substrato à proteína. Observe que é possível ter vários sítios de ligação sem exibir qualquer cooperatividade. Neste caso $n = 1$ apesar do fato de existirem mais do que um sítio de ligação de substrato. Se $n < 1$, a reação exibe uma cooperatividade negativa em relação à ligação ao substrato (WEISS, 1997).

3.8.2 Efeitos da temperatura na cinética enzimática

A temperatura de um sistema é a medida da energia cinética das moléculas nele presentes. Até certo ponto, a taxa de reação de uma enzima aumenta com o aumento da temperatura, em parte porque substratos colidem com sites ativos com mais frequência quando as moléculas se movem rapidamente. Acima dessa temperatura, no entanto, a velocidade da reação enzimática cai bruscamente. A agitação térmica da molécula enzimática perturba as ligações de hidrogênio, ligações iônicas e outras interações fracas que estabilizam a forma ativa da enzima, e a molécula da proteína eventualmente se desnatura. Cada enzima tem uma temperatura ideal na qual sua taxa de reação é maior. Sem desnaturar a enzima, esta temperatura permite a maior número de colisões moleculares e a conversão mais rápida dos reagentes às moléculas do produto (REECE, 2015).

As reações enzimáticas, assim como as demais reações, possuem a constante de velocidade (k) descrita pela equação de Arrhenius, dada pela Equação (4):

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (4)$$

em que A é o fator de frequência, E_a energia de ativação da reação, R a constante universal dos gases e T a temperatura.

A utilização de enzimas em altas temperaturas pode fazer uso do aumento de taxa de reação previsto pela Equação 4, além evitar a contaminação microbiana. Porém, por serem proteínas, sofrem desnaturação, que implica em perda de atividade biológica, quando expostas a temperaturas acima a que se encontram em seu ambiente natural. Acima de uma temperatura crítica, há rápida perda de atividade (CHAPLIN; BUCKE, 1990; FELTRE, 2005; SHULER, 2002).

A desnaturação é a alteração conformacional devido a mudanças nas ligações covalentes na estrutura proteica, como por exemplo as desaminações, ou mesmo através de alterações não covalentes, como um possível rearranjo da cadeia proteica (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

3.8.3 Efeitos do pH na cinética enzimática

As enzimas são moléculas proteicas anfóteras, com grande número de grupos ácidos e básicos, principalmente na sua superfície, que são constantemente modificados de acordo com as constantes de ionização e pH do meio, afetando assim a reatividade dos grupos catalíticos e sítios ativos. A alteração nas taxas de pH afeta a atividade e a estabilidade estrutural da enzima (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

O pH do meio induz a distribuição das cargas da molécula enzimática, as cargas do substrato, dos produtos e das coenzimas, influenciando diretamente no desenvolvimento da reação. A temperatura também atua neste efeito, já que acarreta diretamente na ionização dos grupos (CHAPLIN; BUCKE, 1990; OLIVEIRA, 2007).

O pH ótimo é o pH onde a velocidade de reação catalítica é máxima, podendo ser um valor na direção desejada e diferente no sentido inverso, ou seja, ele será ótimo para a reação considerada. Os valores extremos de pH associados ao tempo e temperatura, causa desnaturação da enzima. Em geral, em um intervalo de 2-3 unidades do pH de cada lado do ponto isoelétrico, este processo é reversível (CHAPLIN; BUCKE, 1990; SHULER, 2002).

O pH afeta diretamente a constante de Michaelis-Menten (K_m), sendo esta mudança independente da velocidade máxima (V_{max}). Chaplin e Bucke (1990) afirmam que quando em concentrações diluídas de substrato, as mudanças de atividade enzimática em função do pH podem ou não ser significativas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Para a produção da enzima FTase, foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, doada pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (LBI/IPT-SP). O *pellet* contendo aproximadamente 5 g de esporos liofilizados do micro-organismo, foi ressuspenso em 10 mL de água destilada estéril e alíquotas de 70 μ L foram inoculadas em meio sólido contendo (em %, m/v): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0, glicerina (Isifar®) 2,5, extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. Após incubação por 7 dias a 30 °C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D. (Tecnal®, modelo TE-371), os esporos produzidos foram coletados por meio de raspagem utilizando alça de Drigalski e aproximadamente 10 mL de solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95 % (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1 % (v/v). A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isifar®) 20,0 % (m/v), cujo volume foi variável, de modo ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, quantificado com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -12 °C.

4.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para a fermentação e crescimento microbiano foi constituído por (em %, m/v): sacarose (Synth®) 15,0, extrato de levedura (Synth®) 0,5, NaNO₃ (Dinâmica®) 0,5, KH₂PO₄ (Synth®) 0,2, MgSO₄.7H₂O (Dinâmica®) 0,05, MnCl₂.4H₂O (Synth®) 0,03 e FeSO₄.7H₂O (Synth®) 0,001 e pH ajustado para 5,5 com uso de solução de NaOH (Synth®) 0,01 mol.L⁻¹. Foram distribuídos 50 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 120 °C e 2,022 atm durante 15 min.

4.3 Construção da curva de crescimento microbiana

Foram inoculados 500 μ L de suspensão contendo cerca de 1×10^7 esporos.mL⁻¹ no meio de cultura descrito no tópico 4.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm ao decorrer de 76 h de processo, com

coleta de amostras em intervalos de tempo pré-determinados. O conteúdo total do frasco foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. A biomassa retida no papel (torta) foi lavada abundantemente com água destilada e seca em estufa por 24 h a 55 °C. A concentração de biomassa foi obtida por meio de massa celular seca por volume (g. L^{-1}). Os experimentos foram realizados em triplicata. A média dos valores de concentração de biomassa foram plotados em um gráfico de concentração de biomassa em função do tempo de fermentação.

4.4 Monitoramento da progressão do pH do caldo de fermentação ao longo do tempo

Concomitantemente com a construção da curva de crescimento microbiana, conforme decrita no tópico 4.3, amostras do caldo fermentado foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados ao decorrer de 76 h de processo, filtradas e seus respectivos valores de pH foram medidos com o auxílio de um pHmetro digital (DigiLab®, Modelo 82588). Os experimentos foram realizados em triplicatas. A média dos valores de pH foram plotados em um gráfico de pH em função do tempo de fermentação.

4.5 Produção de FTases micelial e extracelular por fermentação submersa aeróbia

Foram inoculados 0,5 mL de suspensão (1×10^7 esporos.mL⁻¹) em 50 mL de meio de cultura, conforme descrito no tópico 4.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm com coleta de pontos a cada 8 h, totalizando 72 h de processo. O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. O caldo fermentado (permeado) foi armazenado em tubos do tipo Falcon e a biomassa retida no papel (torta) armazenada, sob refrigeração, em placas de Petri. Devido a rápida degradação do caldo, os ensaios de reações enzimáticas foram realizados imediatamente após a coleta das amostras.

4.6 Determinação da atividade enzimática

Definiu-se uma unidade de atividade enzimática de transfrutossilação como a quantidade de enzima que produz um micromol (1 μmol) de FOS por minuto, expresso como soma da concentração de 1-kestose, nistose e β -frutofuranosilnistose sob as condições ensaiadas. Já uma

unidade de atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera um micromol (1 μmol) de frutose por minuto sob as condições reacionais do ensaio (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; GANAIE; GUPTA, 2014; OTTONI et al., 2012).

As concentrações de açúcares obtidos durante os ensaios de reação enzimática foram descritos pelas seguintes equações:

$$[ART]=[F]+[G] \quad (5)$$

$$[F]=[ART]-[G] \quad (6)$$

$$[FOS]=[G]-[F] = 2[G]-[ART] \quad (7)$$

em que [ART], [F], [G] e [FOS] representam as concentrações de açúcares redutores totais, frutose, glicose e FOS, respectivamente, expressas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.6.1 Determinação das atividades de transfrutossilação e hidrolítica extracelulares

Em um tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 1,2 mL de solução tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6% (m/v). Tal mistura foi previamente aquecida durante 10 min a 50 °C até atingir equilíbrio térmico (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; OTTONI et al., 2012;).

A seguir, foi iniciada a reação enzimática ao se adicionar 0,1 mL de caldo fermentado contendo FTase extracelular. Esta reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 190 rpm, a 50 °C e por 60 min e, posteriormente, interrompida por banho de água fervente durante 10 min, seguida por banho de gelo (OTTONI et al., 2012; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007).

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) e de glicose foram determinadas pelos métodos DNS e GOD-PAP, respectivamente. Obtidos tais valores, foram quantificadas as concentrações de frutose pela Equação (6) e de frutooligossacarídeos (FOS) pela Equação (7). A atividade de transfrutossilação extracelular (A_t^{extra}) foi calculada pela Equação (8).

$$A_t^{extra} = \frac{[FOS].V_R}{t_R.V_{enzimático}} \quad (8)$$

em que [FOS] representa a concentração de frutooligossacarídeos ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo de reação (min) e $V_{enzimático}$ o volume do caldo fermentado (solução enzimática) (mL).

Já a atividade hidrolítica extracelular (A_h^{extra}) foi determinada pela Equação (9).

$$A_h^{extra} = \frac{[F] \cdot V_R}{t_R \cdot V_{enzimático}} \quad (9)$$

em que [F] representa a concentração de frutose ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo de reação (min) e $V_{enzimático}$ o volume do caldo fermentado (solução enzimática) (mL).

4.6.2 Determinação das atividades de transfrutossilação e hidrolítica miceliais

Em um tubo Falcon de 15 mL foi adicionado 0,05 g de micélio úmido juntamente com 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 M e pH 5,5. Iniciou-se a reação enzimática pela adição de 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v) previamente termostaticada a 50 °C até atingir equilíbrio térmico (OTTONI et al., 2012; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007).

Esta reação foi conduzida por 60 min a 50 °C e 190 rpm em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) e interrompida pela fervura durante 10 min, seguida por banho de gelo (OTTONI et al., 2012; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007). Ao término, o meio reacional foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para a determinação das concentrações de açúcares redutores totais e glicose métodos DNS (tópico 4.7) e GOD-PAP (tópico 4.8), respectivamente. Posteriormente, com a concentração destes açúcares, foi possível determinar as concentrações de frutose pela Equação (6) e de FOS pela Equação (7). A atividade de transfrutossilação micelial ($A_t^{micelial}$) foi calculada pela Equação (10).

$$A_t^{micelial} = \frac{[FOS] \cdot V_R}{t_R \cdot m_{micélio}} \quad (12)$$

em que [FOS] representa a concentração de FOS ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R o volume do meio reacional (L), t_R o tempo da reação (min) e $m_{micélio}$ a massa de micélio úmido (g).

Já a atividade hidrolítica micelial ($A_h^{micelial}$) foi determinada pela Equação (11).

$$A_h^{micelial} = \frac{[F] \cdot V_R}{t_R \cdot m_{micélio}} \quad (11)$$

em que [F] refere-se a concentração de frutose ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), V_R ao volume do meio reacional (L), t_R ao tempo da reação (min) e $m_{micélio}$ a massa de micélio úmido (g).

4.7 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

A concentração de açúcares redutores totais (ART) presentes no meio reacional foi determinada pelo método DNS adaptado (MALDONADI et al., 2013; MILLER, 1959; SANTOS-MORIANO et al., 2015). O método consiste na reação entre o açúcar redutor total e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, que é reduzido ao ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (BOBBIO; BOBBIO, 2005)

Primeiramente, foi preparada uma solução de DNS (*Reagente A*), constituída por 13,98 g.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®), 5,86 g.L⁻¹ de metabisulfito de sódio (Na₂S₂O₅) (Dinâmica®), 5,37 mL/L de fenol fundido a 50 °C (C₆H₅OH) (Isifar®) e 7,48 g.L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Dinâmica®) (C₇H₄N₂O₇). A solução antioxidante (*Reagente B*) foi composta por 15,1 g.L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) (Dinâmica®).

A quantificação dos ART foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 1,0 mL da amostra oriunda da reação enzimática, em 1,0 mL de *Reagente A* sob agitação vigorosa. A reação foi conduzida em banho maria a 100 °C por 5 min e interrompida, por resfriamento em banho de água e gelo por 5 min, seguido pela adição de 16 mL de *Reagente B*.

Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio espectrofotômetro (Edutec ®, modelo EEQ901A-B) a 540 nm, visando obter as absorbâncias e, conseqüentemente, determinar as concentrações dos AR mediante auxílio da curva analítica, obtida do método DNS, utilizando glicose como padrão (Figura 30, Apêndice A).

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

4.8 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose, presente no meio reacional, foi determinada pelo método GOD-PAP, conforme também utilizado nos trabalhos de Ganaie e Gupta (2014), Vega e Zúniga-Hansen (2011) e Oliveira, (2007). O método consiste em um kit enzimático contendo glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminofenazona (4-AF), tampão fosfato pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato.

A oxidação da glicose pela glicose oxidase produz peróxido de hidrogênio, que é oxidado por meio da peroxidase que, em conjunto com o 4-AF e o 4-hidroxibenzoato, produzem coloração rosácea ou vermelha (BOBBIO; BOBBIO, 2005; WONG et al., 2008). O kit enzimático utilizado no presente trabalho foi da marca Laborlab®.

A quantificação de glicose foi realizada pela adição, em tudo de ensaio, de 50 µL da amostra oriunda da reação enzimática, em 5 mL de solução reagente (kit enzimático). A reação foi conduzida em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37 °C por 5 min ou a temperatura de 15-25 °C por 25 min.

A coloração final foi estável por 30 min. Posteriormente, alíquotas do meio reacional foram analisadas com auxílio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) a 505 nm, visando obter as absorbâncias e, então, determinar as concentrações de glicose mediante auxílio da curva analítica, obtida do método GOD-PAP (Figura 31, Apêndice A).

O mesmo procedimento analítico foi realizado para a obtenção do branco, porém, substituindo a amostra, oriunda da reação enzimática, por água destilada.

4.9 Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica e de transfrutossilação

Foram inoculados 0,5 mL de suspensão de esporos (1×10^7 esporos.mL⁻¹) no meio de cultura descrito no tópico 4.2. A fermentação foi conduzida em agitador orbital do tipo shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30 °C e 200 rpm com coleta de pontos a cada 8 h, totalizando 72 h de fermentação.

O conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi filtrado em papel do tipo Whatman n°1 com diâmetro de 90 mm. A partir do caldo fermentado obtido, realizou-se a determinação das atividades enzimáticas extracelulares (tópico 4.6.1). A determinação das atividades enzimáticas miceliais (tópico 4.6.2) foram conduzidas utilizando o micélio produzido e coletado na filtração. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 Influência da temperatura do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutossilacção

Após a determinação do tempo de fermentação cujas enzimas apresentaram máxima atividade, realizou-se uma nova fermentação com este tempo (tópico 4.9), e utilizou-se o micélio e o caldo fermentado obtidos para verificar a variação das atividades enzimáticas em função da temperatura do meio reacional enzimático.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em solução constituída por 1,2 mL tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v). Foram avaliadas as temperaturas nos valores de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 °C, com intuito de se determinar a temperatura de máxima atividade das FTases. As atividades extracelulares e miceliais foram determinadas conforme os métodos descrito nos tópicos 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.11 Estabilidade térmica da FTase extracelular e micelial

Incubou-se 0,05 g de micélio e 0,1 mL de caldo fermentado, obtidos no tempo de fermentação cujas enzimas apresentaram máxima atividade, em 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5, durante 60 min visando avaliar a estabilidade térmica da FTase micelial e extracelular para as temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 65 °C. Após este intervalo de tempo, manteve-se a enzima em banho de gelo durante 10 min, seguido da quantificação das atividades hidrolítica e de transfrutossilacção das enzimas extracelular e micelial, conforme métodos descritos nos tópicos 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente.

4.12 Influência do tempo e da temperatura reacionais na produção de FOS

Para investigar a produção de FOS em misturas reacionais para diferentes temperaturas e tempos de reação, 0,1 mL de caldo fermentado ou 0,05 g de micélio úmido foram adicionados em 1,2 mL de solução tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5, e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6 % (m/v).

As reações enzimáticas foram conduzidas a 40, 50 e 60 °C, e alíquotas do meio reacional foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min. As concentrações de açúcares foram quantificadas conforme métodos descritos nos tópicos 4.7 e 4.8, e a média obtidas plotadas em gráficos do tipo concentração molar (mmol.L⁻¹) versus tempo de reação (min). Os ensaios foram

realizados em duplicata. Visando avaliar a linearidade da produção de FOS nestas temperaturas, realizou-se regressões lineares (Equação 12), tendo como (y) a média das concentrações do açúcar e como (x) o tempo reacional. Considerou-se lineares as regressões cujos coeficientes de determinação (R^2) foram superiores as 0,90.

$$y = a + b.x \quad (12)$$

4.13 Influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutossilagem

Utilizando-se o micélio (biomassa celular) e o caldo fermentado coletados durante o tempo de fermentação cujas enzimas apresentaram máxima atividade (tópico 4.9), foi possível investigar a variação das atividades enzimáticas em função do pH do meio reacional e obter a faixa que as FTases apresentaram máximo valor de atividade para este parâmetro.

Os ensaios de atividade foram conduzidos em 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹ cujos valores de pH foram de 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5, 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6% (m/v) e em temperatura de reação 50 °C. As atividades extracelulares e micelial foram determinadas conforme o descrito nos tópicos 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.14 Estabilidade ao pH da FTase extracelular e micelial

Incubou-se 0,05 g de micélio úmido e 0,1 mL de caldo fermentado, ambos coletados durante o tempo de fermentação cujas enzimas apresentaram máxima atividade (tópico 4.9), em 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 M em pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 por 24 h a 4 °C. Após este intervalo de tempo, adicionou-se 3,7 mL de solução de sacarose P.A. (Synth®) 63,6% (m/v), pré-aquecida a 50 °C e quantificou-se as atividades enzimáticas extracelular e micelial, conforme métodos descritos nos tópicos 4.6.1 e 4.6.2 respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.15 Influência da concentração de sacarose do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilagem e hidrolíticas e estudo da cinética enzimática da FTase

Para o estudo dos efeitos da concentração de substrato na cinética enzimática, as reações envolvendo as enzimas FTases foram conduzidas em triplicata utilizando, como meio reacional, uma solução constituída por 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 M, pH 5,5 e 3,7 mL

de solução de sacarose P.A. (Synth®) com concentrações de 100, 200, 400, 500, 636 e 800 g.L⁻¹, resultando nas seguintes concentrações finais de sacarose: 74,0, 148,0, 296,0, 370,0, 470,06 e 592,0 g.L⁻¹. As atividades de transfrutossilação extracelular e micelial foram determinadas de acordo com os métodos descritos nos tópicos 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente, utilizando o micélio (biomassa celular) e o caldo fermentado coletados durante o tempo de fermentação cujas enzimas apresentaram máxima atividade (tópico 4.9). Os valores destas atividades foram equivalentes à velocidade *V* do modelo cinético de Michaelis-Menten, (Equação 2) ou do modelo de Hill (Equação 3). Assim, as constantes cinéticas foram calculadas por regressão de modelos não-lineares com auxílio do *software* OriginPro 2016®.

4.16 Otimização das atividades enzimáticas extracelular e micelial em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático

Visando investigar os efeitos dos parâmetros temperatura e pH do meio reacional enzimático nas atividades hidrolítica e de transfrutossilação das FTases extracelular e micelial, realizou-se um planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2². Para os estudos de planejamento, foram selecionadas temperaturas de 40 e 50 °C e valores de pH de 5,5 e 8,0 como níveis principais (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007). Desta forma, elaborou-se uma matriz de experimentos (TABELA 4), composta por 11 ensaios. As análises estatísticas foram efetuadas pela Análise de Variância (ANOVA) mediante auxílio do *software* Statistica® versão 8.0®.

Tabela 4 - Matriz de experimentos contendo valores codificados e reais.

Ensaio	Valores Codificados		Valores Reais	
	Temperatura	pH	Temperatura (°C)	pH
1	1	1	50	8,0
2	1	-1	50	5,5
3	-1	-1	40	5,5
4	-1	1	40	8,0
5	-1,414	0	38	6,75
6	1,414	0	52	6,75
7	0	-1,414	45	5,00
8	0	1,414	45	8,50
9	0	0	45	6,75
10	0	0	45	6,75
11	0	0	45	6,75

Fonte: do autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudos de produção de FTases extracelular e micelial por fermentação submersa

Neste tópico estão descritos os resultados obtidos na etapa de produção das enzimas FTases extracelular e micelial por fermentação submersa aeróbia, em que são apresentados (i) o estudo do crescimento microbiano em meio sintético, (ii) o monitoramento do pH do caldo fermentado ao decorrer do processo fermentativo e (iii) a influência do tempo de fermentação nos valores de atividade enzimática.

5.1.1 Construção da curva de crescimento microbiana e monitoramento do pH do caldo de fermentação

A curva de crescimento microbiana foi contruída de acordo com o método descrito no tópico 4.3. A Figura 5 apresenta o perfil da curva de crescimento do fungo *Aspergillus oryzae* IPT 301 em função do tempo de fermentação. Foi possível identificar a fase lag de crescimento durante as primeiras 8 h do processo seguida da fase log até as 48 h, em que se constatou um pico de concentração de biomassa igual a $9,35 \pm 1,26 \text{ g.L}^{-1}$.

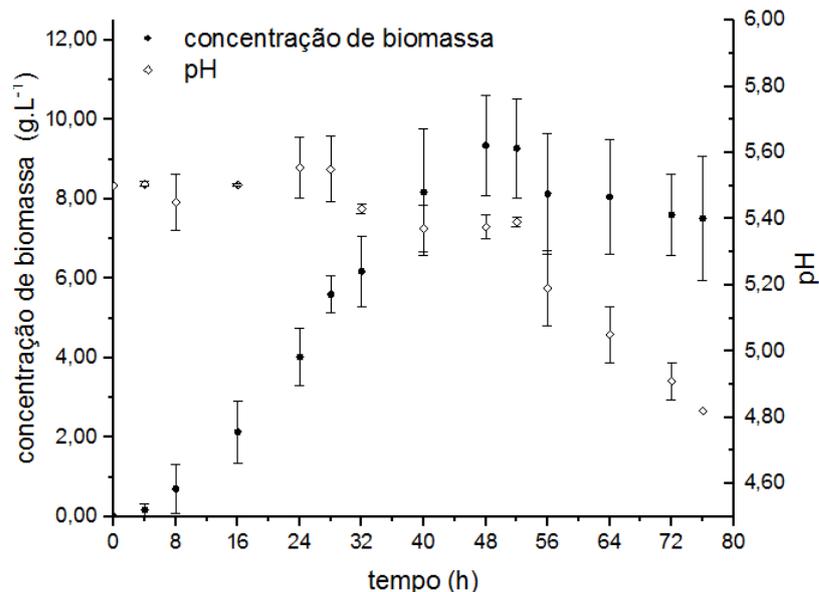


Figura 5 - Concentração da biomassa celular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e progressão do pH em função do tempo a 30°C.

Fonte: do autor.

Após 56 h de fermentação, foi observado a fase estacionária para a curva de crescimento que se estendeu até o término do processo, cuja concentração de biomassa obtida foi de $7,51 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$. Pelo perfil da curva de crescimento não se pode afirmar que a fase de declínio ou morte celular foi atingida, uma vez que as concentrações de biomassa permaneceram constantes a partir de 56 h de fermentação

O valor máximo da concentração de biomassa de *A. oryzae* obtido mostrou-se aproximadamente 2,0 vezes maior que o reportado por Ottoni et al. (2012) em que, utilizando um meio de cultura com composições similares, obteve uma concentração de $4,85 \text{ g.L}^{-1}$ de micélio. Cuervo-Fernandez et al. (2007), sob as mesmas condições experimentais, produziu $7,39 \pm 1,10 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa de *A. oryzae* IPT-301, ou seja, um valor 21,0 % menor ao obtido no presente trabalho.

Ressalta-se ainda que Ottoni et al. (2012), visando aumentar a produção de biomassa, realizaram a fermentação em meio de cultura otimizado, composto majoritariamente por $320,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, $7,13 \text{ g.L}^{-1}$ de ureia, $2,11 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, cuja concentração de biomassa obtida foi de $10,46 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, 12,0 % maior que a concentração de biomassa produzida neste trabalho.

O fato da atividade enzimática da FTase estar intimamente ligada a quantidade de biomassa produzida durante a fermentação, permite sugerir, *a priori*, a utilização de tempo de fermentação de até 52 horas, já que se tem maior quantidade de enzima presente no caldo fermentado (FTase extracelular) e aderida ao micélio (FTase intracelular). Outros experimentos foram realizados visando atestar tal afirmação, visto que a atividade enzimática depende de diversos outros fatores, como o pH do meio fermentado, temperatura, pH do meio reacional da atividade enzimática e concentração de substrato (CHAPLIN; BUCKE, 1990; JUNG et al. 1989; SHULER, 2002). Os estudos de Cuervo-Fernandez et al. (2007) apuram que os caldos de fermentação produzidos pelas cepas *Aspergillus oryzae* IPT-301 e *Aspergillus niger* ATCC 20611, IPT-608 e IPT-615 apresentaram valores finais de pH iguais 5,70, 4,21, 5,43 e 5,53, respectivamente.

Conforme ilustrado na Figura 5, a progressão do pH do caldo fermentado deste estudo para o *Aspergillus oryzae* IPT-301, em que o pH inicial foi de 5,50, mostrou a acidificação do meio de cultura, com valor final de pH igual a 4,82. Segundo Maiorano et al. (2009), a produção máxima de FTase, utilizando *Aspergillus oryzae* IPT-301 como fonte produtora da enzima encontra-se na faixa entre 4,5 a 5,0, ao passo que, a produção máxima de biomassa foi verificada para caldos fermentados com pH 5,0. O *A. oryzae* é produtor de proteases ácidas, responsáveis

pela clivagem das ligações peptídicas e liberação de aminoácidos, o que ocasiona a acidificação do meio de cultura, interferindo também nas atividades enzimáticas (CASTRO; SATO, 2014; TSUJITA et al., 1997).

A Figura 6 mostra o perfil de crescimento do *Aspergillus oryzae* IPT-301 em termos logarítmicos de biomassa, na qual foi verificada a presença das fases de crescimento, como a fase lag até as 8 h de fermentação, a fase log entre as 8 e 48 h, e por fim, a fase estacionária que se estendeu até 76 h de processo. Ganaie e Gupta (2014) verificaram a fase lag do *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* para produção de FOS em até 10 e 14 h de processo, respectivamente.

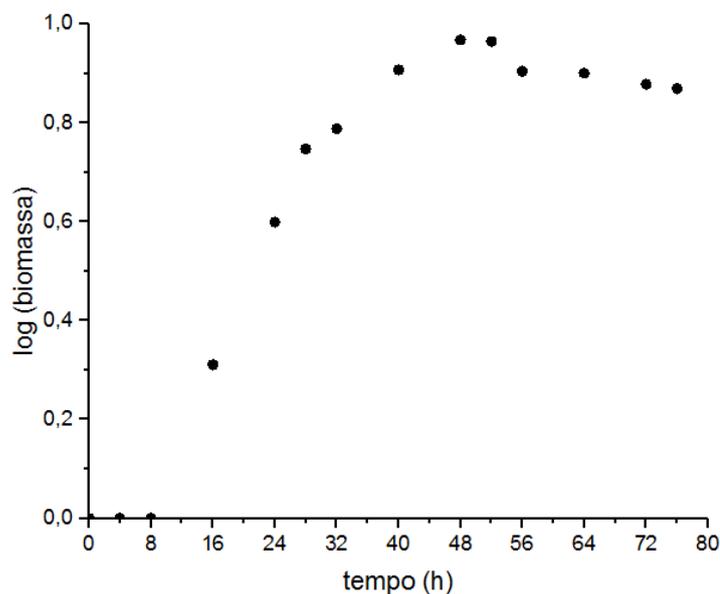


Figura 6 - Curva de crescimento do *Aspergillus oryzae* IPT-301 em termos de logarítmicos de concentração de biomassa a 30°C.

Fonte: do autor.

5.1.2 Influência do tempo de fermentação nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica

As atividades de transfrutossilação e hidrolítica extracelulares em função do tempo de fermentação estão dispostas na Figura 7. Foi observado um pico de produção da enzima FTase para 64 h de processo ($19,76 \pm 0,56 \text{ U.mL}^{-1}$). Por outro lado, obteve-se uma baixa atividade hidrolítica ($1,65 \pm 0,31 \text{ U.mL}^{-1}$). Portanto, para o mesmo período, foi obtido uma razão igual a $12,22 \pm 1,82$ entre as atividades avaliadas (Figura 7), indicando maior produção de FOS durante o processo fermentativo, já que elevados valores de razão A_t/A_h indicam predominância da atividade de transfrutossilação frente à hidrolítica (HIDAKA, 1988).

Conforme reportado por Hidaka et al., (1988), Hidaka, (1988) e Cuervo-Fernandez et al., (2007), a análise das razões entre as atividades é de extrema importância, uma vez que altas conversões de sacarose em FOS são obtidas quando há elevada atividade de transfrutossilação e baixa atividade hidrolítica. Além disso, uma elevada razão entre as atividades torna-se um fator positivo ao se considerar o uso industrial da enzima (HERNALSTEENS, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Cuervo-Fernandez et al. (2007), utilizando o *A. oryzae* IPT-301 e meio de cultura similares ao do presente trabalho, obteve a produção máxima da enzima em 72 h de fermentação. Foram obtidos valores de atividades hidrolítica e de transfrutossilação iguais a $3,44 \text{ U.mL}^{-1}$ e $17,90 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente, correspondendo a uma razão entre as atividades de 5,2.

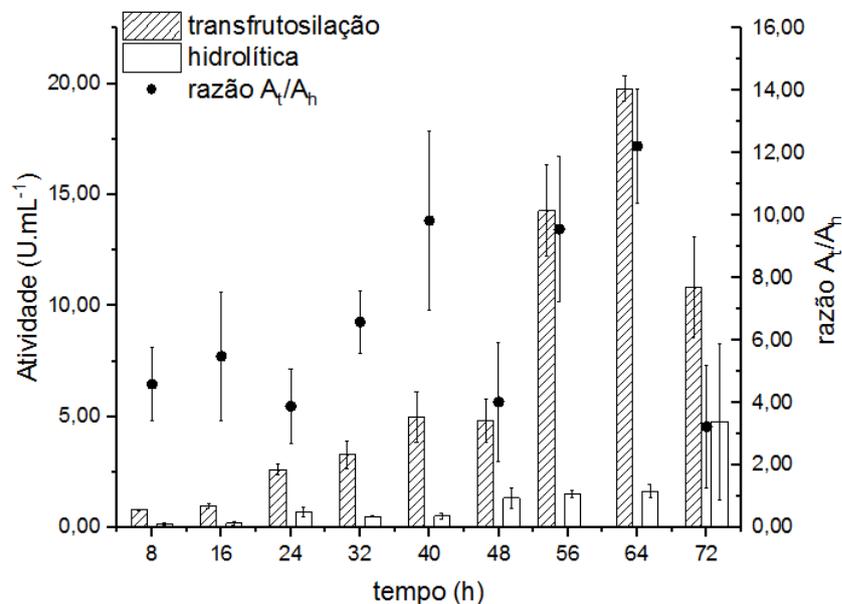


Figura 7 - Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilação (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C e tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5.

Fonte: do autor.

Para o presente trabalho, durante 72 h de processo, a atividade de transfrutossilação obtida ($10,82 \pm 2,26 \text{ U.mL}^{-1}$) foi relativamente menor do que a atividade de transfrutossilação obtida em 64 h de fermentação, (Figura 7), resultando em um valor baixo de $3,3 \pm 1,96$ de razão entre as atividades (Figura 7). A diminuição dos valores de atividade de transfrutossilação é atribuída a produção concomitante de proteases ácidas pelo *A. oryzae* IPT-301, atuando em sua faixa de pH que apresenta suas maiores atividades, e desativando a FTase extracelular (CASTRO e SATO, 2014; TSUJITA et al., 1997). Diante dos resultados obtidos, definiu-se

64 h como o tempo de processo favorável para a produção da FTases utilizando o *Aspergillus oryzae* IPT 301 como micro-organismo produtor em meio de cultura sintético, sendo este período utilizado como tempo de fermentação padrão para as demais etapas deste trabalho.

A Figura 8 mostra a influência do tempo de fermentação nas atividades miceliais. Para 72 h de processo, foram obtidas atividades de transfrutossilação (A_t) e hidrolítica (A_h) iguais a $524,55 \pm 177,10 \text{ U.g}^{-1}$ e $141,07 \pm 53,12 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente. Cuervo-Fernandez et al. (2007), utilizando FTase micelial produzida por *A. oryzae* IPT-301 em mesmo tempo de processo e para as mesmas condições experimentais, obtiveram atividade hidrolítica de $44,9 \pm 1,9 \text{ U.g}^{-1}$ e de transfrutossilação igual a $487,2 \pm 34,1 \text{ U.g}^{-1}$.

A maior atividade hidrolítica obtida no presente estudo pode ser atribuído a alteração do pH no caldo de fermentação o que acarretou, possivelmente, na elevada atividade hidrolítica da enzima micelial desde o crescimento da biomassa. Outra hipótese deve-se também à coexistência de β -frutofuranosidase, também produzida pelo *Aspergillus oryzae* IPT-301, enzima esta responsável pelas elevadas atividades hidrolíticas (GIRALDO et al., 2014, KURAKAKE et al., 2010; CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007)

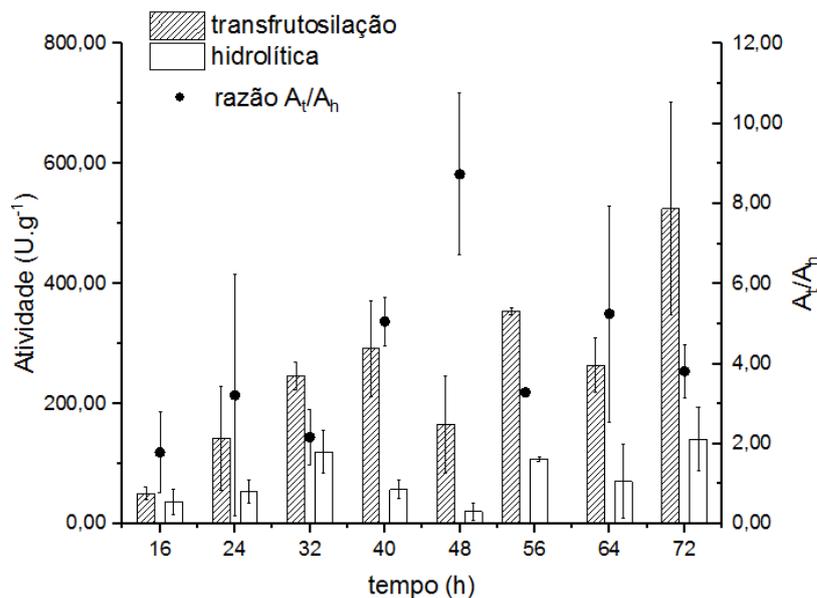


Figura 8 - Influência do tempo de fermentação nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilação (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5.

Fonte: do autor.

De acordo com Ganaie e Gupta (2014), a maior produtividade de FOS pode ser obtida em 36 h de fermentação quando utilizadas as cepas dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. No entanto, os autores ressaltam que, ao se realizar, concomitantemente, a produção de FTase e FOS, uma baixa produtividade do açúcar pode ser constatada, visto que a produção de

biomassa e, conseqüentemente, de enzima ocorrem em uma faixa ótima de temperatura entre 28 a 30 °C, enquanto que a máxima produção de FOS pode ser verificada para uma faixa ótima compreendida entre 50 a 60 °C, em que se observa elevada atividade de transfrutossilacão da FTase, tornando o processo de duas etapas, conforme proposto por Wang (2015), mais vantajoso.

Na Figura 8 estão dispostos também os valores das razões entre as atividades da FTase micelial, determinados ao longo do tempo de fermentacão. O maior valor de razão obtido entre as atividades miceliais (A_t / A_h) foi de $8,73 \pm 2,02$ para 48 h, enquanto que, para 72 h, um valor de $3,82 \pm 0,67$ foi alcançado. Para o mesmo tempo de processo (72 h), Cuervo-Fernandez et al. (2007) obteve uma razão de atividades igual a 10,86.

Nas Figuras 7 e 8, nota-se que os desvios padrão apresentados para a razão entre as atividades de transfrutossilacão e hidrolítica mostraram-se relativamente elevados. Segundo Nguyen et al. (1999), os desvios elevados estão associados à presença, em diferentes concentrações, de mais de um tipo de β -frutofuranosidade tanto no micélio quanto no caldo fermentado.

5.2 Estudos de caracterizacão das FTases extracelular e micelial

Neste tópicó são descritos os resultados obtidos dos estudos de caracterizacão das FTases extracelular e micelial produzidas mediante avaliacaõ da influencia do pH, temperatura e concentraçãõ do meio reacional enzimático, bem como os estudos da cinética enzimática e das estabilidades das enzimas frente ao pH e temperatura.

5.2.1 Influência do pH do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilacão e hidrolítica

A influencia do pH do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilacão e hidrolítica das FTases extracelulares e miceliais foram avaliadas de acordo com o tópicó 4.13. A Figura 9 relaciona as atividades de transfrutossilacão e hidrolítica de FTase extracelular em função do pH do meio reacional. Nota-se que, para valores de pH relativamente baixos (meios reacionais muito ácidos), as atividades hidrolíticas são predominantes.

Contudo, para pH variando entre 4,5 e 6,0, as atividades de transfrutossilacão e hidrolítica mostraram-se estáveis com valores de $18,00 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,30 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente, caracterizando, portanto, a faixa de pH que a enzima apresentou máxima atividade, ocorrendo

decréscimo nos valores de atividade de transfrutoseilação e aumento da atividade hidrolítica em pH 6,5. Maiorano et al. (2008), Cuervo-Fernandez et al. (2007), Sangeetha et al. (2005), Katapodis et al. (2004) e Hayashi et al. (1990) reportaram a mesma faixa de pH que a FTase microbiana extracelular apresentou máxima atividade.

Ressalta-se que em faixas muito ácidas, a atividade hidrolítica de FTase pode ser confundida com a hidrólise ácida da sacarose, que ocorre espontaneamente em pH ácido. Oliveira (2007) reportou em seus estudos a ocorrência de hidrólise ácida das moléculas de sacarose em pH inferior a 4,0, tanto para FTases livres ou imobilizadas, inferindo, portanto, na baixa produção de FOS para esta faixa de pH.

A influência do pH na razão entre as atividades extracelulares é ilustrada na Figura 9. A ocorrência de hidrólise ácida da molécula de sacarose conjuntamente com a atividade hidrolítica elevada acarretam, possivelmente, a diminuição da razão entre as atividades da FTase extracelular na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 4,0.

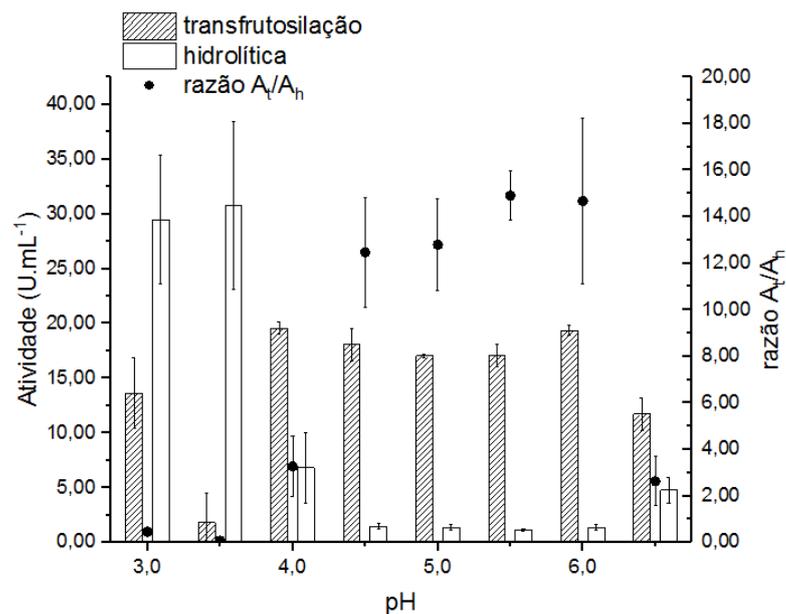


Figura 9 - Influência do pH nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutoseilação (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06% (m/v) a 50 °C e tampão tris acetato 0,2 mol.L⁻¹.

Fonte: do autor.

Nota-se que na faixa de pH compreendida entre 4,5 a 6,0, a razão entre as atividades manteve-se aproximadamente constante, com valor de $13,71 \pm 1,26$, indicando a predominância da atividade de transfrutoseilação e, portanto, sugerindo esta faixa de pH como de máxima atividade de transfrutoseilação.

Os estudos de Maiorano et al. (2008) reportam que a faixa ótima de pH para a FTase oriunda de *Aspergillus oryzae*, compreendeu-se entre 5,0 e 7,0. Outros trabalhos, como o de Ganaie et al. (2014) e Kurakake (1996), verificam que a enzima, também produzida por *Aspergillus oryzae*, apresentou valores elevados de atividades de transfrutoseilação para uma faixa de pH compreendida entre 5,0 a 7,0, com pico de atividade em pH 6,0. FTases produzidas por outros micro-organismos possuem faixa ótima de pH próximas aos reportados neste trabalho, como por exemplo as oriundas de *Lactobacillus reuteri* (pH entre 5,0 e 5,5) e *Lactobacillus johnsonii* (pH entre 4,5 e 6,0) (ANWAR et al., 2008; VAN HIJUM et al., 2003).

A influência do pH nas atividades da FTase micelial é mostrada na Figura 10. Assim como verificado para a FTase extracelular (Figura 9), a atividade hidrolítica foi predominante na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 4,0. A partir do pH 4,5 houve um aumento expressivo da atividade de transfrutoseilação, culminando no pH 6,0, em que se obteve um valor de $780,79 \pm 6,22 \text{ U.g}^{-1}$ enquanto que a atividade hidrolítica apresentou um valor de $76,70 \pm 28,17 \text{ U.g}^{-1}$.

Pode-se afirmar, pelos resultados experimentais obtidos, que o pH cuja enzima micelial apresentou maior atividade, também se mostrou compreendido entre 4,5 a 6,0, em que maiores e menores valores de atividades de transfrutoseilação e hidrolítica foram obtidos, respectivamente. Enzimas com uma larga faixa de estabilidade em pH são preferíveis para a sua produção, estocagem e aplicações industriais (XU et al., 2015).

Cuervo-Fernandez et al. (2004) obtiveram para a enzima produzida por *Aspergillus oryzae* 27H, valor de atividade de transfrutoseilação máxima ($900,00 \text{ U.g}^{-1}$) em pH 6,0, conduzindo a reação enzimática a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e utilizando, como substrato, solução concentrada de sacarose 81,1 % (m/v). Xu et al. (2015) reportou que a enzima produzida por *Penicillium oxalicum* apresentou máxima atividade de transfrutoseilação para uma faixa de pH entre 4,5 a 6,5, ao passo que a FTase produzida por *Aspergillus aculeatus* apresentou pH ótimo de 5,5. Estudos de Katapodis et al. (2004) verificaram que a produção de FOS utilizando a enzima intracelular de *Sporotrichum thermophilus* foi ótima em pH 6,0, significativamente diferente do pH ótimo de hidrólise (pH 4,0).

A Figura 10 indica o comportamento da razão entre as atividades miceliais em função do pH do meio reacional. Foram observados valores de razão aproximadamente nulos para a faixa de pH 3,0-3,5, alcançando-se, em pH 6,0, uma razão entre as atividades de transfrutoseilação e hidrolítica de $11,09 \pm 3,78$. O valor determinado foi equivalente ao obtido por Cuervo-Fernandez et al. (2004), que atingiu a razão de 11,25 para o mesmo pH. O autor

assume que o pH ótimo para a atividade de FTase micelial está em torno de 5,5-6,0, valores de pH satisfatórios por exibirem maior razão entre as atividades (A_t/A_h).

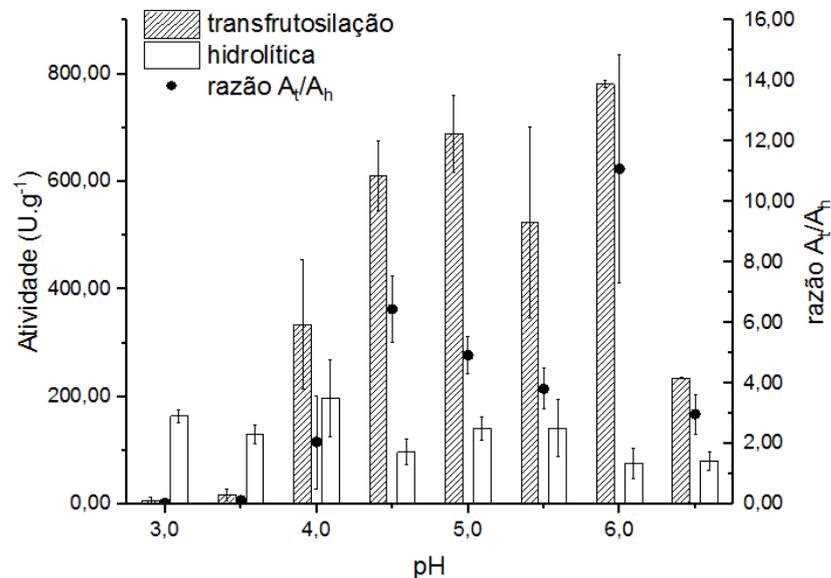


Figura 10 - Influência do pH nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilação (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) a 50 °C, tampão tris acetato 0,2 mol.L⁻¹.

Fonte: do autor.

Cuervo-Fernandez et al. (2007) reportaram notável aumento da razão entre as atividades da enzima produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301 para valores de pH variando entre 5,5 a 8,0. Estudos de Katapodis et al. (2004) indicaram que meios de cultura neutros (pH 7,0) favoreceram a produção enzimática de FOS a partir da fermentação do *Sporotrichum thermophilus*, enquanto que a síntese de FOS durante a fermentação foi limitada a meios de cultura ácidos. Trabalhos de Chen et al. (2014), Santos-Moriano et al. (2015) e Hirayama et al. (1989) reportam a faixa ótima de pH entre 5,5-6,5 (*A. japonicus*), 5,5-5,8 (*Zymomonas mobilis*) e 5,0-6,0 (*A. niger* ATCC 20611), respectivamente, para elevadas atividades de transfrutossilação micelial.

5.2.2 Influência da temperatura do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica

A influência da temperatura nas atividades enzimáticas também foi avaliada. Conforme verificado na Figura 11, a FTase extracelular apresentou atividades máxima ($19,53 \pm 0,056$ U.ml⁻¹) e mínima ($1,65 \pm 0,031$ U.mL⁻¹) de transfrutossilação e hidrolítica,

respectivamente, para a temperatura de 50 °C. Observa-se, portanto, que a faixa de temperatura que a FTase extracelular apresentou máxima atividade, esteve compreendida entre 45 a 55 °C, resultando em valores relativamente elevados de atividade de transfrutoseilação. Para as temperaturas de 30 e 35 °C houve o predomínio da atividade hidrolítica, possivelmente favorecida pela ação da β -frutofuranosidase, atuando como hidrolase em temperaturas mais amenas. Para as temperaturas de 60 e 65 °C, foi observado uma queda na atividade de transfrutoseilação e aumento significativo da atividade hidrolítica, sendo esta faixa ótima para a hidrólise enzimática da sacarose, conforme reportado por Almeida et al. (2005) nos seus estudos utilizando β -frutofuranosidase oriunda de *Cladosporium cladosporioides*.

Estudos de Yun (1996) e Hayashi et al. (1990) indicaram que a faixa ótima de temperatura para a enzima produzida por *Aureobasidium pullulans* e *Aureobasidium* sp., respectivamente, manteve-se entre 45 e 55 °C. Maiorano et al. (2009) e Madlová et al. (2000) obtiveram uma faixa de temperatura ótima para a atividade de transfrutoseilação compreendida entre 50 °C a 60 °C para FTases produzidas a partir de *A. oryzae* e *Aureobasidium pullulans*.

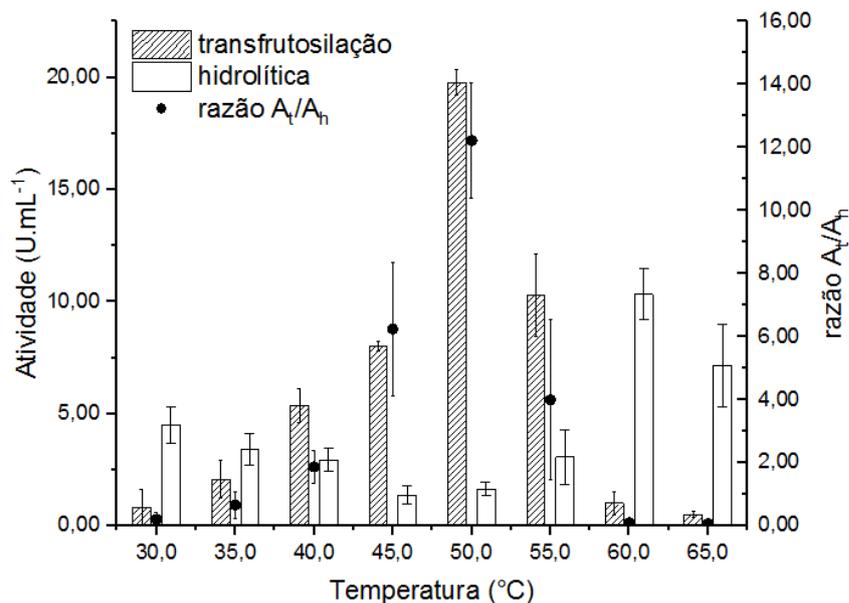


Figura 11 - Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutoseilação (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5.

Fonte: do autor.

Hayashi et al. (1990) obtiveram atividades de transfrutoseilação expressivas a 50 °C para a enzima produzida por *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. Tais resultados são corroborados pelos elevados valores de razões (A_t/A_h) na faixa entre 45 a 55 °C (Figura 11). Em temperaturas

fora dessa faixa, as razões são irrelevantes, não sendo recomendado o uso de FTase extracelular. A razão máxima obtida foi de $12,22 \pm 1,81$, isto é, aproximadamente 2,4 vezes maior ao valor da razão obtido por Cuervo-Fernandez et al. (2007) nas mesmas condições experimentais utilizando o *A.oryzae* IPT-301 como micro-organismo produtor de FTases.

O comportamento da FTase micelial está ilustrado na Figura 12 em que foi verificado um comportamento análogo ao da FTase extracelular. Contudo, por haver maior estabilidade devido à aderência da enzima ao micélio (SCHUURMANN et al., 2014), a faixa de temperatura apresentou-se levemente superior, compreendida entre 45 a 60 °C. Ocorreu a 60 °C o aumento da atividade hidrolítica, devido a atuação da β -frutofuranosidase em sua faixa ótima de temperatura (60 a 65°C), sendo esta enzima mais estável e ativa por conta da melhor proteção conferida pelo micélio (SCHUURMANN et al., 2014).

Estudando o efeito térmico em β -frutofuranosidase, Xu et al. (2015) obtiveram a faixa de temperatura ótima para a enzima entre 25 a 50 °C. A partir de 60 °C foi verificado rápido decréscimo na atividade de transfrutossilação. Santos-Moriano et al. (2015) e Hirayama et al. (1989) reportaram a faixa ótima de temperatura entre 35 a 50 °C e 50 a 60 °C, respectivamente, sendo que fora dessas faixas, ocorreu rápida desativação enzimática. Chen et al. (2014) reportaram que a temperatura ótima de transfrutossilação para a β -frutofuranosidase produzida por *Lactobacillus plantarum* foi de 37°C.

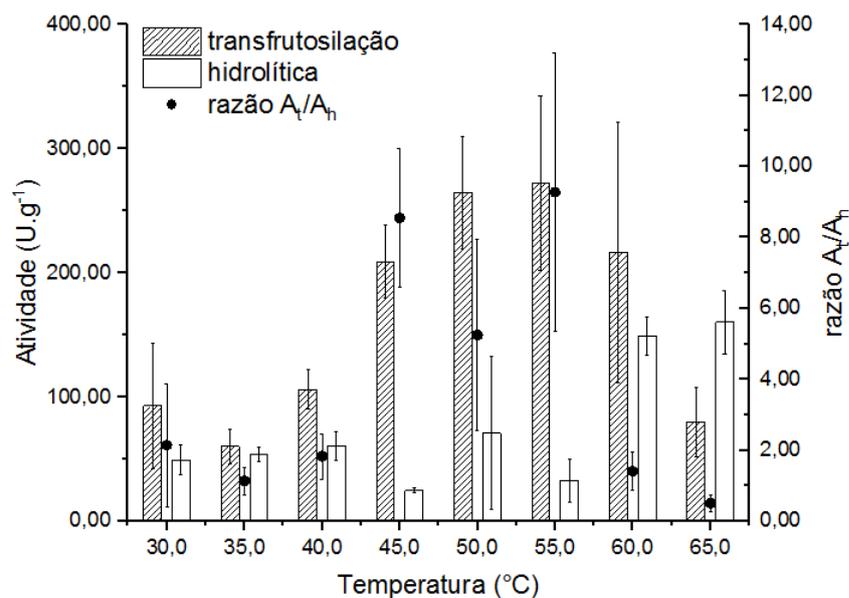


Figura 12 - Influência da temperatura nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilação (A_t) da FTase micelial e na razão entre as atividades (A_t/A_h) em solução de sacarose 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5.

Fonte: do autor.

A Figura 12 demonstra o comportamento das razões A_t/A_h miceliais, cuja faixa de temperatura, onde a FTase micelial apresentou máxima atividade, foi confirmada entre 45 e 55 °C, faixa esta similar quando comparada à FTase extracelular. Em valores absolutos, a maior razão obtida foi de $9,28 \pm 3,92$ para a temperatura de 55 °C, correspondendo a um valor de 0,85 vezes menor ao obtido por Cuervo-Fernandez et al. (2007) nas mesmas condições experimentais. Cuervo-Fernandez et al. (2004) verificaram atividades de transfrutossilação elevadas a 60 °C para FTses produzidas por *Aspergillus* 27H e picos de atividades hidrolíticas a 55 °C. Os autores obtiveram razões de atividades relativamente baixas, cerca de 3,5 e 5,0, quando avaliados os efeitos térmicos em pH 5,5 do meio reacional.

5.2.3 Influência da concentração de sacarose do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica e estudo da cinética enzimática da FTase

A influência da concentração de sacarose nas atividades da FTase extracelular foi avaliada conforme método descrito no tópico 4.15 (Figura 13). Observou-se que, para toda faixa de concentração de substrato avaliada, a atividade de transfrutossilação manteve-se elevada, acima de 10 U.mL^{-1} . L'Hocine et al. (2000) e Hayashi et al. (1990) separaram e purificaram a FFase da FTase de complexo enzimático obtidos a partir das cepas *Aspergillus niger* AS0023 e *Aureobasidium* sp. ATCC 20524, respectivamente. Neste caso, os autores obtiveram apenas a atividade hidrolítica para a β -frutofuranosidase e atividade de transfrutossilação para a FTase. Por analogia, sendo a atividade hidrolítica oriunda do complexo enzimático produzido pelo *Aspergillus oryzae* IPT-301, praticamente constante, e a atividade de transfrutossilação suficientemente elevada, pode-se supor que ocorreu, majoritariamente, a produção de FTase.

Verificou-se que a faixa de concentração de sacarose entre 296,00 a 592,00 g.L^{-1} apresentou baixa variação, com o valor médio de atividade de transfrutossilação igual a $14,58 \pm 0,09 \text{ U.mL}^{-1}$. Este dado corrobora com a hipótese de haver, majoritariamente, FTase no caldo fermentado, já que em baixas concentrações de sacarose, a β -frutofuranosidase possui apenas atividade hidrolítica, ao contrário da FTase que possui elevada atividade de transfrutossilação mesmo em baixas concentrações do substrato.

Assim, afim de obter elevados rendimentos voltados a produção de FOS, torna-se possível diminuir a concentração de sacarose para até 296,00 g.L^{-1} sem perdas nos valores de atividade de transfrutossilação. A razão A_t/A_h para a FTase também é avaliada na Figura 13. Nota-se a partir de 296,00 g.L^{-1} elevadas razões, superiores a 6,0. Cuervo-Fernandez et al. (2007) obtiveram a razão de 5,2 para esta enzima nas mesmas condições experimentais.

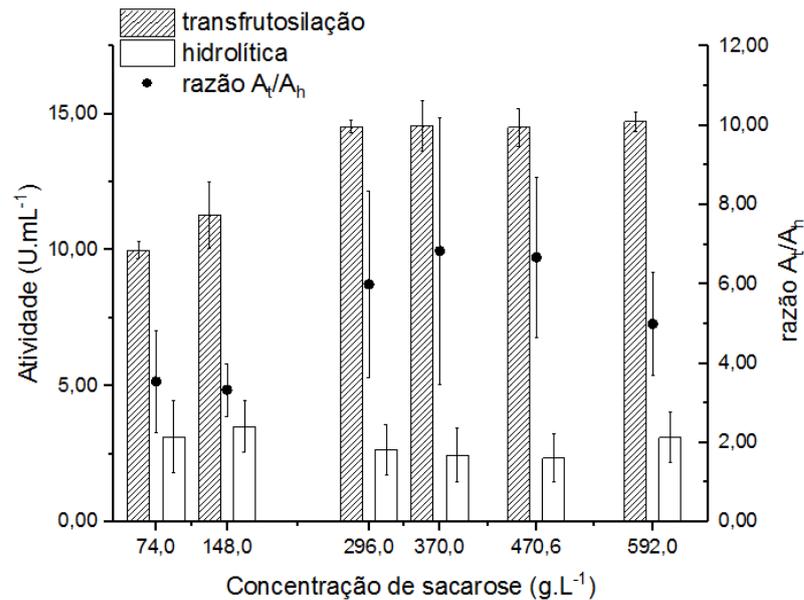


Figura 13 - Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilacção (A_t) da FTase extracelular e na razão entre as atividades (A_t/A_h) a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5.

Fonte: do autor.

Vega e Zúniga-Hansen (2011) verificaram que para o complexo comercial Rohapect CM®, o efeito da concentração de sacarose não foi significativo, pois a FTase possui a habilidade de ligar-se ao aceptor, no caso um resíduo frutossil, e excluir a água que provocaria a hidrólise. Porém, a concentração de sacarose possui forte influência no rendimento de produção de FOS.

A cinética enzimática foi avaliada conforme descrito no tópico 4.15. Dixon e Webb (1979) reportaram que diversas enzimas podem ter a cinética preditas pelo modelo de Michaelis-Menten, conforme já elucidado no tópico 3.8.1. Pela Figura 14, foi comprovado que a FTase extracelular, produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301, se ajustou satisfatoriamente ao modelo michaeliano e não sofreu inibição para as diferentes concentrações de sacarose avaliadas. O coeficiente de determinação de erro (R^2) está disposto na Tabela 5.

Tabela 5 - Coeficiente de determinação de erro do modelo de Michaelis-Menten para a FTase extracelular.

Modelo	Coeficiente de determinação (R^2)
Michaelis -Menten	0,991

Fonte: do autor

Na Tabela 6 estão dispostos os valores dos parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten, obtidos com auxílio do software Origin 8.0. Diferentemente dos trabalhos de Silva (2009) e Oliveira (2007), o modelo de Michaelis-Menten ajustou-se satisfatoriamente à FTase extracelular em toda faixa de concentração de sacarose estudada. Estes autores verificam em seus trabalhos que a partir de concentrações de substrato acima de 500 e 600 g.L^{-1} , respectivamente, ocorre inibição pelo substrato, porém mesmo com ajuste pelo modelo clássico michaeliano com inibição, não foi possível a obtenção dos parâmetros cinéticos que suportassem a hipótese de tal inibição para os dados obtidos.

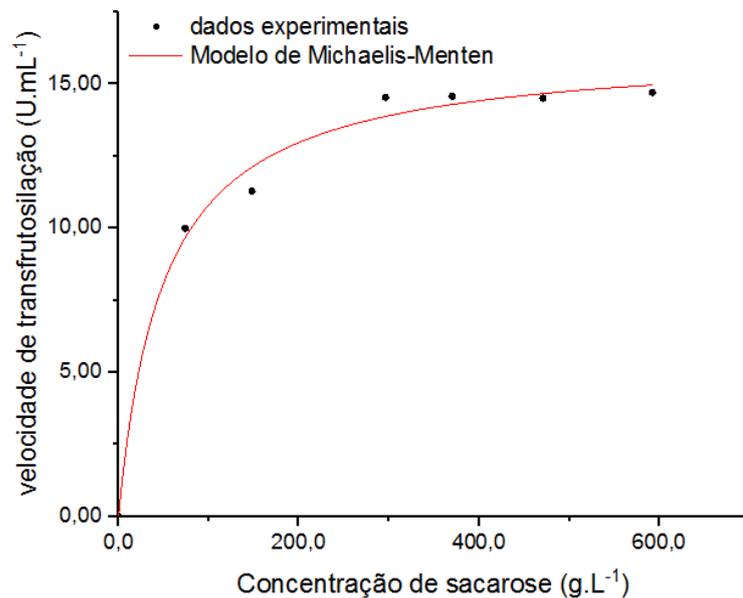


Figura 14 – Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo cinético de Michaelis-Menten (linha contínua) para a FTase extracelular a 50 °C em tampão tris-acetato 0,2 mol.L^{-1} (pH 5,5).

Fonte: do autor.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos da FTase extracelular

Parâmetros cinéticos	
V_{\max} (U.mL^{-1})	16,23
K_m (g.L^{-1})	50,41

Fonte: do autor.

O perfil do efeito de concentração de substrato nas atividades da FTase micelial é descrito pela Figura 15. Opostamente ao verificado nos efeitos de concentração da FTase extracelular, observou-se maior sensibilidade da enzima perante a concentração de sacarose no

meio reacional, com valor máximo de atividade de transfrutossilação ($282,57 \pm 27,33 \text{ U.g}^{-1}$) quando utilizada solução de sacarose a $470,6 \text{ g.L}^{-1}$.

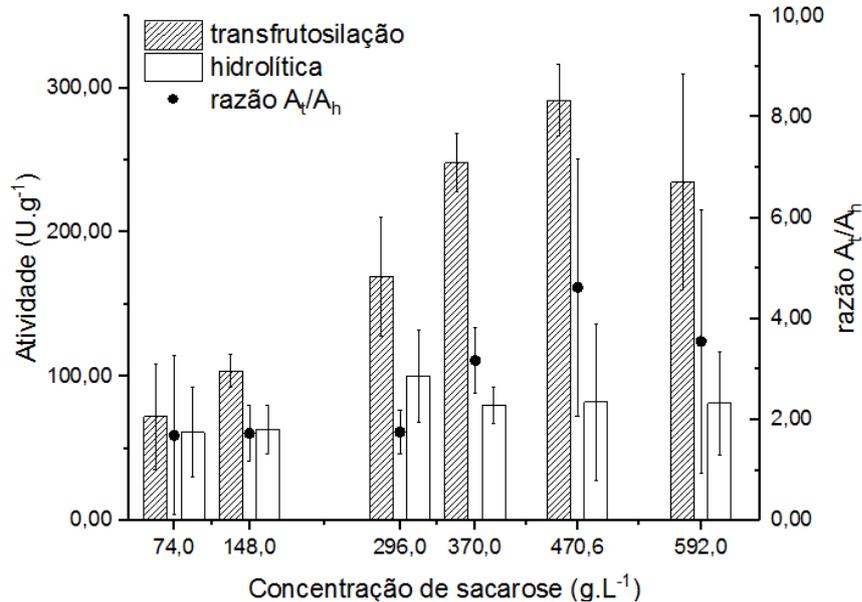


Figura 15 - Influência da concentração de substrato nas atividades hidrolítica (A_h) e de transfrutossilação (A_t) da FTase micelial e na razão (A_t/A_h) a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5.

Fonte: do autor.

Oliveira (2007) verificou que a FTase produzida pelo gênero *Rhodotorula* sp. e imobilizada em nióbio obteve maior atividade de transfrutossilação em concentração de 500 g.L^{-1} de sacarose, com valor de $72,03 \text{ U.g}^{-1}$, seguido de inibição em concentrações superiores, enquanto no presente trabalho o valor concentração de $470,6 \text{ g.L}^{-1}$ foi de $259,14 \pm 0,43 \text{ U.g}^{-1}$. Assim, percebe-se que a cepa *Aspergillus oryzae* IPT-301 possui maior potencial em termos de atividade de transfrutossilação quando comparada até mesmo com FTase imobilizada produzidas por outras espécies.

A atividade hidrolítica manteve-se com valor médio de $63,66 \pm 15,00 \text{ U.g}^{-1}$ para toda faixa de concentração de sacarose avaliada. Assim, a atividade hidrolítica apresentou baixa sensibilidade quando comparada com a atividade de transfrutossilação, cujos desvios atingiram até $82,32 \text{ U.g}^{-1}$ de variação de acordo com a concentração de substrato utilizada.

O comportamento da razão A_t/A_h em função da concentração de substrato é descrito na Figura 15. Foi observado que para baixas concentrações, o efeito na razão mostrou-se pouco relevante. Porém a partir de $296,0 \text{ g.L}^{-1}$, houve maior influência, atingindo um pico de $5,84 \pm 2,03$, valor de razão este 0,53 vezes menor ao obtido por Cuervo-Fernandez et al. (2007)

quando utilizada concentração de 470,6 g.L⁻¹ de sacarose. Para concentrações superiores, foi observado um leve decréscimo na atividade de transfrutossilatação. Este fato pode estar atribuído à uma possível inibição pelo substrato ou por algum dos produtos formados (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

Cuervo-Fernandez et al. (2004) obtiveram para o *Aspergillus* 27H maior razão A_v/A_h micelial (10,3) quando o meio reacional continha 615 g.L⁻¹ de sacarose, sendo esta elevada concentração responsável pelo aumento da velocidade de formação de FOS devido à saturação do complexo enzimático com o substrato. Em menores concentrações de sacarose, o autor observou rápida formação de frutose e glicose, com inexpressiva formação de FOS. Katapodis et al. (2004) verificaram que, para o *Streptococcus thermophile*, a concentração ótima de sacarose foi de 250g.L⁻¹, similar aos estudos de Takeda et al. (1994) e Yun et al. (1990).

Santos-Moriano et al. (2015) reportaram que, para concentrações de sacarose iguais a 600 g.L⁻¹, ocorre a formação de uma substancial concentração de FOS. Este fato deve-se à competição que se estabelece entre a síntese de FOS de cadeia curta e a formação de levanos de elevada massa molecular. Em concentrações elevadas de sacarose, o substrato assume o papel de aceptor de grupos intermediários frutossil-enzima, favorecendo a formação de FOS de cadeia curta. Já em baixas concentrações de sacarose, os levanos, a serem formados, possuem baixa afinidade para com os resíduos de frutose.

A cinética enzimática da transfrutossilatação foi avaliada seguindo o modelo Hill, cujo valor do coeficiente de determinação de erro (R^2) foi de 0,926, indicando que este modelo explica 92,6 % das variações dos valores de velocidade de transfrutossilatação micelial. Este modelo está ilustrado na Figura 16. O modelo de Michaelis-Menten também foi testado, contudo o baixo valor do coeficiente de determinação torna inválido nas explicações das variações das velocidades de transfrutossilatação (TABELA 7).

O Modelo de Hill descreve quantitativamente o grau de cooperatividade em cinéticas não michaelianas. O coeficiente de Hill (n) indica quantas zonas de união de substrato de uma enzima afetam a afinidade de união do substrato no resto das zonas de união, sendo que valores positivos e superiores a um apontam que ocorreu cooperatividade positiva, ou seja, a primeira molécula de substrato que reage com a enzima provoca o incremento da afinidade do resto dos sítios ativos para com o substrato. Assim, por exibir n igual a 1,41, a FTase micelial revelou o comportamento cooperativo positivo.

Na Tabela 8 estão dispostos os valores dos parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Hill. Hernalsteens (2006) reporta que a enzima produzida pela cepa *Rhodotorula* sp. e

purificada também apresentou cinética cooperativa de acordo com o Modelo de Hill para a velocidade de transfrutossilacção, cujos valores dos parâmetros V_{max} , $K_{0,5}$ e n foram de 299,0 $g.L^{-1}$, 236,1 $\mu mol.L^{-1}$ e 2,2, respectivamente.

Comparando as FTases micelial e extracelular, observou-se um aumento expressivo da constante de Michaelis-Menten (K_m) de 465,64 %, indicando que a FTase micelial exibiu menor afinidade pelo substrato.

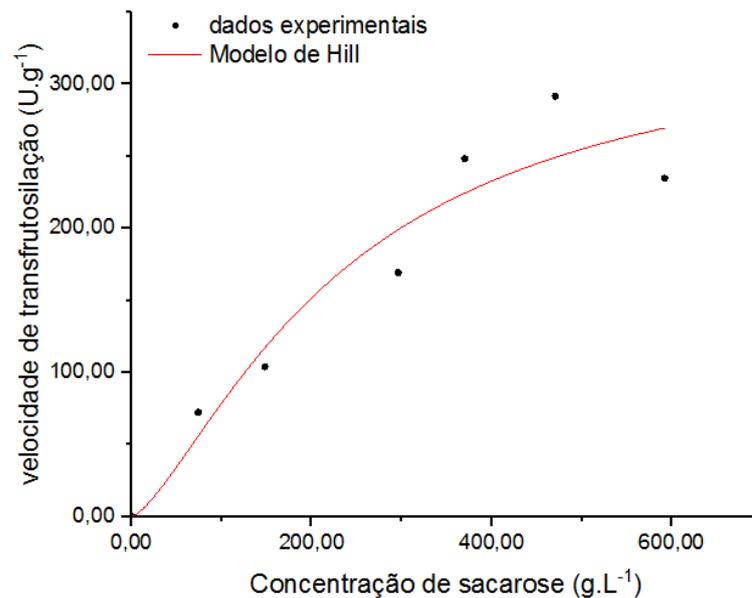


Figura 16 – Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo cinético de Hill (linha contínua) para a FTase micelial a 50 °C e tampão tris-acetato 0,2 $mol.L^{-1}$ (pH 5,5).

Fonte: do autor.

Tabela 7 - Coeficientes de determinação de erro obtidos para diferentes modelos cinéticos enzimáticos para a FTase micelial.

Modelo	Coefficiente de determinação (R^2)
Michaelis -Menten	0,863
Hill	0,926

Fonte: do autor.

Segundo Oliveira (2007), este fato pode ser parcialmente explicado pelo aumento dos efeitos difusivos causados pela imobilização da enzima no micélio. Huallanco (2010) verificou que a FTase imobilizada, produzida por *Rhodotorula* sp., possui K_m de 785 $g.L^{-1}$, sendo inibida apenas por sacarose, valor este dado como irreal pelo autor. A obtenção do valor real se deu após a construção de um modelo próprio a ser aplicado para a FTase ($K_m = 197,9 g.L^{-1}$).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da FTase micelial

Parâmetros Cinéticos	
V_{\max} (U.g ⁻¹)	342,23
$K_{0,5}$ (g.L ⁻¹)	234,73
n	1,41

Fonte: do autor.

Hirayama et al. (1989) obtiveram para a enzima purificada de *Aspergillus niger* ATCC 20611 valores de K_m iguais a 0,29 mol.L⁻¹, 0,80 mol.L⁻¹, 0,14 mol.L⁻¹ e 0,37 mol.L⁻¹, para os açúcares sacarose, 1-kestose, nistose e frutossilnistose, respectivamente. Os resultados reportados pelos autores indicaram que a purificação da enzima aumentou sua afinidade pelo substrato e por FOS de baixo grau de polimerização com mais de dois resíduos de frutose. Este fenômeno também foi reportado por Chen et al. (2014), quando se estudou a enzima produzida por *Lactobacillus plantarum* mutante.

Xu et al. (2015) obtiveram valores de K_m e V_{\max} iguais a 163 mmol.L⁻¹ e 800,1 U.mg⁻¹, respectivamente, para a FTase purificada de *Penicillium oxalicum*. Hirayama et al. (1989) reportaram valor de K_m igual 0,29 mol L⁻¹ da enzima purificada produzida por *Aspergillus niger* ATCC 20611. No trabalho deste autor, verificou-se que à medida em que a concentração de sacarose aumenta, ocorre a inibição da atividade hidrolítica pelo substrato e aumento na atividade de transfrutossililação, sendo esta última 50 % superior. L'Hocine et al. (2000) obtiveram comportamento similar para a FTase produzida por cepas de *Aspergillus niger*.

5.2.4 Efeito do pH na estabilidade das FTases extracelular e micelial

A estabilidade frente ao pH das FTases extracelular e micelial foi estudada conforme método descrito no tópico 4.14. As enzimas foram avaliadas, de acordo com suas atividades de transfrutossililação, para uma faixa de pH compreendida entre 3,0 a 8,0 após incubação por 24 horas a 4 °C em solução tampão tris-acetato 0,2 M.

De acordo com a Figura 17, foi observado que a FTase extracelular se mostrou pouco estável (atividade relativa de transfrutossililação menor que 80 %) para a faixa de pH investigada, exibindo máxima atividade relativa de transfrutossililação em pH 6,0, resultado este diferente do obtido por El-Beih et al. (2009), cuja estabilidade de FTase produzida por *Cryptococcus* sp. LEB-V2 ocorreu em pH 4,5.

Os estudos de Anwar et al. (2008) reportaram que a FTase produzida por *Lactobacillus johnsonii* foi estável na faixa de pH entre 4,5 – 6,0, com retenção mínima de 85 % da atividade de transfrutossilção inicial. Já van Hijum (2003) reporta que a FTase oriunda da fermentação do *Lactobacillus reuteri* foi estável na faixa de pH entre 3,7 – 6,5.

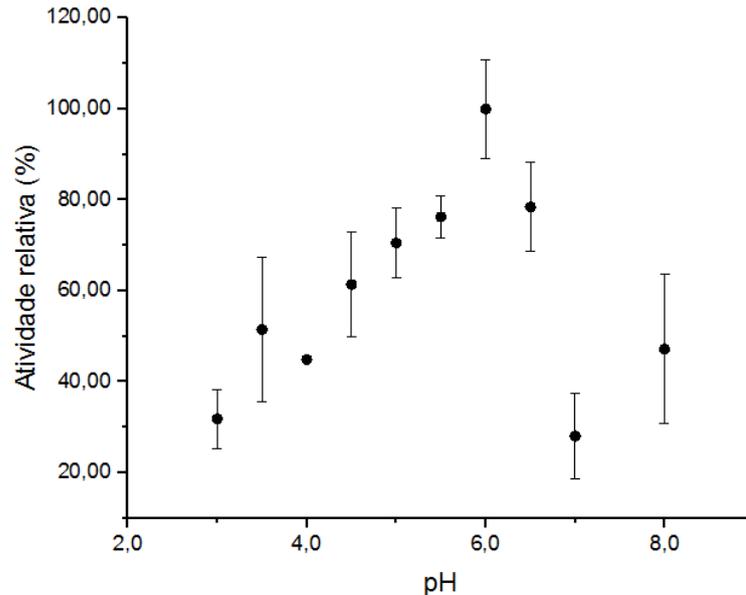


Figura 17 – Estabilidade da FTase extracelular frente ao pH após 24 h de incubação em solução de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Atividade de transfrutossilção a 100% de $14,96 \pm 1,62 \text{ U.mL}^{-1}$.

Fonte: do autor.

Ao contrário da FTase extracelular, a enzima micelial mostrou-se estável para uma faixa de pH compreendida entre 6,0 a 8,0, em que suas atividades relativas de transfrutossilção apresentaram valores superiores a 80 % (Figura 18).

Ressalta-se que enzimas estáveis para uma ampla faixa de pH são preferíveis por sua fácil produção, estocagem e aplicação industrial (XU et al., 2015, HAYASHI et al., 1990), características estas apresentadas pela FTase micelial, justificando, portanto, sua promissora aplicação em processos enzimáticos voltados à produção de FOS.

Os trabalhos de Lateef et al. (2007) e Sangeetha et al. (2005) reportaram a estabilidade de FTases miceliais produzidas por *Aureobasidium pullulans* CFR 77 e *Aspergillus oryzae* CFR 202 para faixas de pH 3,5-10,0 e pH 5,0-7,0, respectivamente.

Hayashi et al. (1990) verificaram que FTases produzidas por *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 mostraram-se estáveis, após 20 h de incubação, para faixa de pH 5,0-6,0, com atividades relativas de transfrutossilção próximas a 90 %.

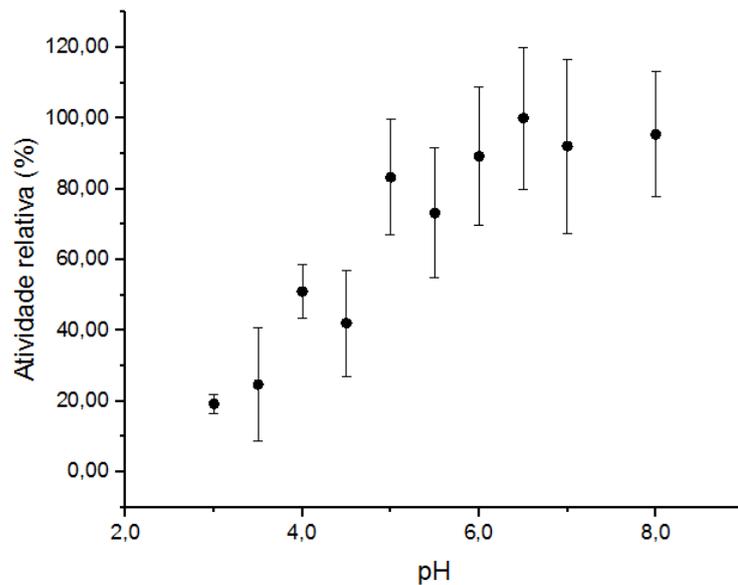


Figura 18 – Estabilidade da FTase micelial frente ao pH após 24 h de incubação em solução de tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Atividade de transfrutoseilação a 100% de $189,23 \pm 37,82 \text{ U.g}^{-1}$.

Fonte: do autor.

5.2.5 Efeito da temperatura na estabilidade das FTases extracelular e micelial

A estabilidade térmica das FTases extracelular e micelial foi estudada conforme método descrito no tópico 4.11. As enzimas foram avaliadas, de acordo com suas atividades de transfrutoseilação, para uma faixa de temperatura compreendida entre 30 a $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ após incubação por 60 min em solução tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5.

A Figura 19 mostrou que a FTase extracelular foi estável apenas em temperaturas inferiores a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em que a atividade de transfrutoseilação foi retida em até 96 %. Em temperaturas superiores a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ocorreu acentuado decréscimo da atividade, sendo que apenas 44,26 % da atividade inicial foi mantida para a temperatura de $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Xu et al., (2015) reportaram que a enzima, produzida por *Penicillium oxalicum*, manteve-se com até 80 % da atividade de transfrutoseilação inicial para uma faixa de temperatura entre $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Estudos de Chen et al. (2014) mostraram que a enzima produzida por *Lactobacillus plantarum* manteve-se estável para temperaturas inferiores a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e, para temperaturas superiores a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, apenas 5,2 % da atividade de transfrutoseilação inicial foi preservada.

Estudos de Madlová et al. (2000) comprovaram que FTases de *Aureobasidium pullulans* foram rapidamente inativadas quando submetidas a temperaturas maiores que $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mesmo quando em presença de elevadas concentrações de substrato.

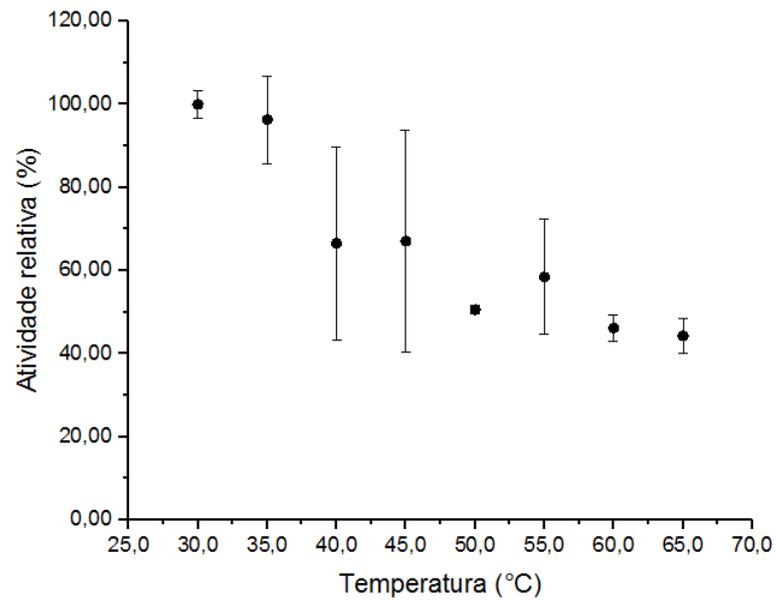


Figura 19 - Estabilidade térmica da FTase extracelular avaliada para diferentes temperaturas após incubação por 1 h em tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5. Atividade de transfrutossilacção a 100% de 22,65 ± 0,72 U.mL⁻¹.

Fonte: do autor.

Analisando a Figura 20, verificou-se que a FTase micelial manteve-se estável para uma faixa de temperatura variando entre 30 e 40 °C, cujas atividades relativas de transfrutossilacção permaneceram entre 80 a 100 %.

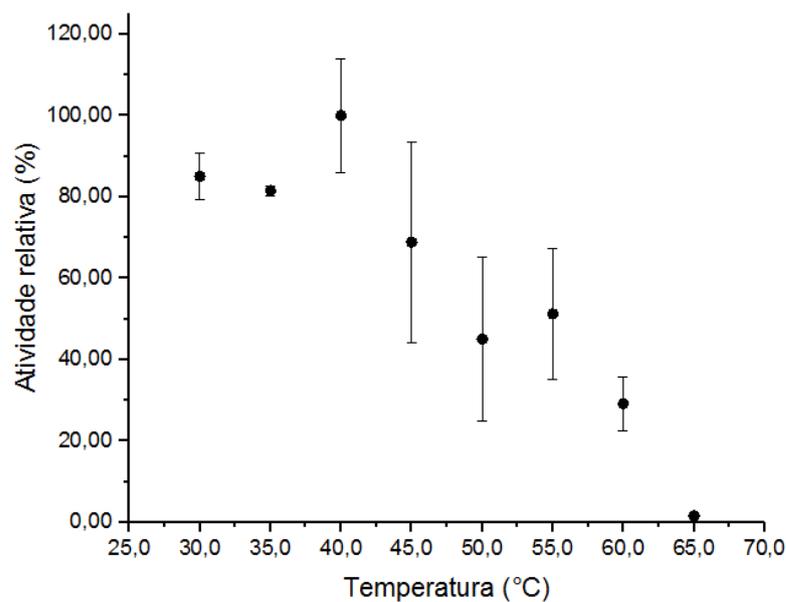


Figura 20 - Estabilidade térmica da FTase micelial avaliada para diferentes temperaturas após incubação por 1 h em tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,5. Atividade de transfrutossilacção a 100% de 418,56 ± 58,44 U.mL⁻¹

Fonte: do autor.

Para temperaturas superiores a 45 °C, foi observado um decréscimo acentuado da atividade enzimática até se atingir a completa inativação da enzima a 65 °C.

Comportamentos similares também foram reportados nos estudos de Hayashi et al. (1990), em que a FTase intracelular de *Aureobasidium* sp. ATCC 20254 apresentou baixa estabilidade térmica para temperaturas superiores a 50 °C até completa inativação em 70 °C após 15 min de incubação.

5.2.6 Influência do tempo e da temperatura reacionais na produção de FOS

O curso da reação de transfrutossilacção foi avaliado conforme método descrito no tópico 4.12 e a Figura 21 ilustra a formação de FOS a partir da FTase extracelular. Observou-se que a melhor condição de síntese de FOS ocorreu a 50 °C, 470,6 g.L⁻¹ de sacarose, solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5, e agitação de 200 rpm, em que foi produzido 24,77 ± 2,49 mmol.L⁻¹ do açúcar. A partir da Tabela 9, constatou-se que durante o período estudado, houve formação linear satisfatória de concentração de FOS, justificado pelos coeficientes de determinação de erro (R²) das equações de reta geradas superiores a 0,90, para todas as temperaturas avaliadas.

Tabela 9 - Avaliação da linearidade da reação de tranfrutossilacção extracelular em solução de sacarose com concentração inicial de 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,5), agitação orbital de 200 rpm, durante o tempo limite de 120 minutos em diversas temperaturas.

Temperatura de reação (°C)	a	b	R ²
40,00	11,34	0,08	0,96
50,00	9,72	0,11	0,98
60,00	1,93	0,03	0,97

Fonte: do autor.

A síntese de FOS a partir de FTase micelial também foi avaliada, de acordo com o comportamento descrito na Figura 22. Observou-se que a melhor condição de síntese de FOS a partir da FTase micelial ocorreu a 40 °C, 470,6 g.L⁻¹ de sacarose, solução tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5, e agitação de 200 rpm, em que se produziu 244,20 ± 4,87 mmol.L⁻¹ do açúcar. A partir da Tabela 10, constatou-se que, durante o período avaliado, houve formação linear satisfatória de concentração de FOS, justificado pelos coeficientes de determinação de erro (R²) das equações de reta geradas superiores a 0,90, para as temperaturas de 40 e 50 °C. Já

para a temperatura de 60 °C, o coeficiente de determinação de erro foi inferior a 0,90, indicando que a formação de FOS não foi linear para esta temperatura.

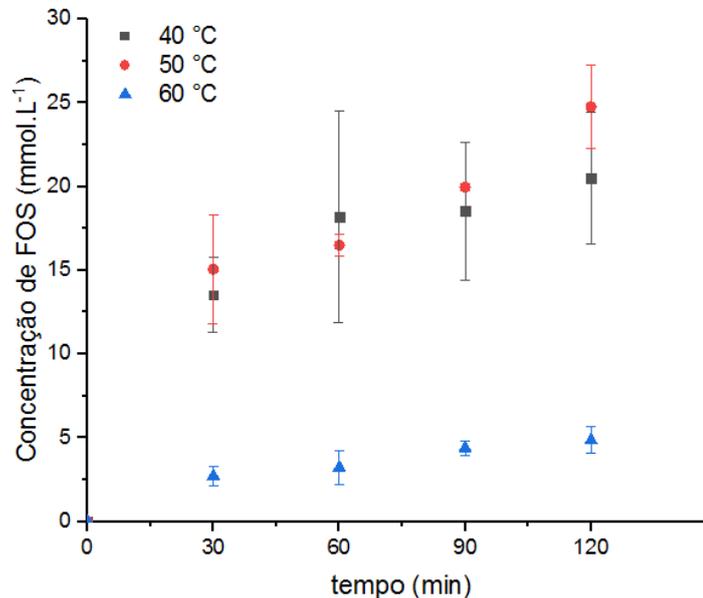


Figura 21- Influência do tempo e da temperatura da reação enzimática na produção de FOS sintetizado por FTase extracelular em solução de sacarose 47,06 % (m/v), tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,5) e agitação de 200 rpm.

Fonte: do autor.

Tabela 10 - Avaliação da linearidade da reação de tranfrutossilação micelial em solução de sacarose com concentração inicial de 47,06 % (m/v) e tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,5), agitação orbital de 200 rpm, durante o tempo limite de 120 minutos em diversas temperaturas.

Temperatura de reação (°C)	a	b	R ²
40,00	81,50	1,41	0,98
50,00	126,67	0,51	0,99
60,00	156,53	0,23	0,76

Fonte: do autor.

Outros autores também estudaram a formação de FOS por meio da reação enzimática. Cuervo-Fernandez et al. (2004) reportaram que em 80 min de reação, a enzima micelial produzida por *Aspergillus* 27h foi capaz de produzir 178 e 343 mmol.L⁻¹ de FOS, em temperatura de 55 °C e concentrações inicial de sacarose de 216 e 615 g.L⁻¹, respectivamente. Observa-se que 55 °C foi a temperatura de máxima atividade da FTase micelial produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301.

Xu et al. (2015) observaram a formação de até 198,0 mmol.L⁻¹ de FOS em duas horas de reação, cujo meio reacional consistiu de uma solução de sacarose com concentração inicial de 500 g.L⁻¹, pH 5,5 e temperatura de 50 °C. Já Vega e Zúniga-Hansen (2011) reportou a produção de 576,0 mmol.L⁻¹ quando utilizado a enzima comercial Rohapect, em pH 5,5, concentração inicial de 720 g.L⁻¹, temperatura de 50°C em 2 h de processo. Chen et al. (2001) obtiveram 448,0 mmol.L⁻¹ de FOS quando utilizado 1 g de célula-imobilizada de *Aspergillus japonicus* a 50 °C, pH 5,5, 37 °C e 120 min .

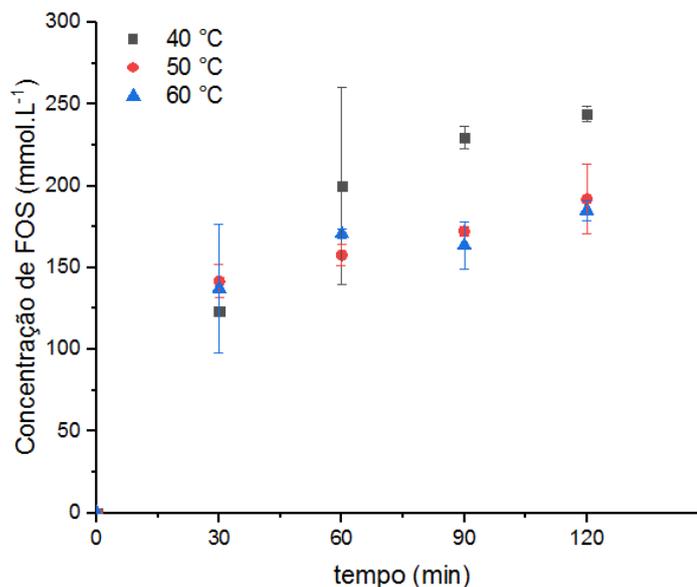


Figura 22- Influência do tempo e da temperatura da reação enzimática na produção de FOS sintetizado por FTase micelial em solução de sacarose 47,06 % (m/v), tampão tris-acetato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 5,5) e agitação de 200 rpm.

Fonte: do autor.

5.3 Otimização das atividades enzimáticas extracelular e micelial em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático

Um planejamento experimental do tipo delineado composto central rotacional 2², com três pontos centrais para a avaliação do erro puro, foi utilizado para investigar os efeitos da temperatura e pH do meio reacional enzimático nas atividades de transfrutossilação e hidrolítica das FTases extracelular e micelial.

Os níveis utilizados, cujos valores codificados e reais estão listados na Tabela 4, e as suas respectivas respostas para as atividades extracelulares de transfrutossilação (A_t^{extra}) e hidrolítica (A_h^{extra}) estão apresentadas na Tabela 11. As respostas foram analisadas estatisticamente e utilizadas para estimar os efeitos principais e de interação mediante aplicação do modelo quadrático com interação. De acordo com as condições utilizadas no processo, os

valores de A_t^{extra} variaram entre 3,75 U.mL⁻¹ a 15,85 U.mL⁻¹. Os pontos centrais para as três respostas apresentaram baixa variação, indicando, portanto, boa repetibilidade do processo.

Tabela 11 - Matriz do delineamento e respostas para a otimização da FTase extracelular produzida em 64 h de fermentação com atividades enzimáticas obtidas a partir de solução de sacarose 470,6 g.L⁻¹.

Valores Codificados (reais)		Atividades Extracelulares	
Temperatura (°C)	pH	Transfrutossilção (U.mL ⁻¹)	Hidrolítica (U.mL ⁻¹)
-1 (40)	-1 (5,5)	4,32	8,29
1 (50)	-1 (5,5)	15,86	1,08
-1 (40)	1 (8,0)	3,80	6,44
1 (50)	1 (8,0)	4,53	7,41
-1,414 (38)	0 (6,75)	8,23	10,15
1,414 (52)	0 (6,75)	9,58	5,66
0 (45)	-1,414 (5,0)	10,03	6,91
0 (45)	1,414 (8,5)	3,75	7,28
0 (45)	0 (6,75)	14,74	1,02
0 (45)	0 (6,75)	14,72	0,65
0 (45)	0 (6,75)	15,84	0,71

Fonte: do autor.

Conforme observado na Tabela 12, todos os efeitos foram significativos para o modelo quadrático com interação para a influência da temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O modelo ajustado foi descrito pela Equação 13.

$$A_t^{extra} = 15,100 + 1,772.(T) - 2,591.(pH) - 3,290.(T)^2 - 4,297.(pH)^2 - 2,702.(pH).(T) \quad (13)$$

em que A_t^{extra} refere-se a atividade de transfrutossilção extracelular (U.mL⁻¹). T e pH representam os valores codificados para temperatura e pH do meio reacional enzimático, respectivamente.

O diagrama de Pareto (Figura 23) corrobora que a um nível de significância de 0,05, todos os efeitos foram significativos na atividade de transfrutossilção extracelular.

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), a aplicação do *Teste F* (Equação 14) permite verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais. O valor de F, calculado pela Equação (14), é comparado com o valor tabelado

de uma distribuição de frequência de referência ($F_{\text{Graus de liberdade do modelo; Graus de liberdade do desvio; Nível de significância}}$).

$$\text{Teste } F = (\text{Quadrados Médios da Regressão})/(\text{Quadrados Médios dos Resíduos}) \quad (14)$$

Tabela 12 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades de transfrutossilção da FTase extracelular.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	15,10000	1,049679	0,000029
temperatura (L)	3,54480	1,285589	0,039961
temperatura (Q)	-6,58000	1,530156	0,007714
pH (L)	-5,18282	1,285589	0,010007
pH (Q)	-8,59500	1,530156	0,002475
pH x temperatura	-5,40500	1,818097	0,031053

Fonte: do autor.

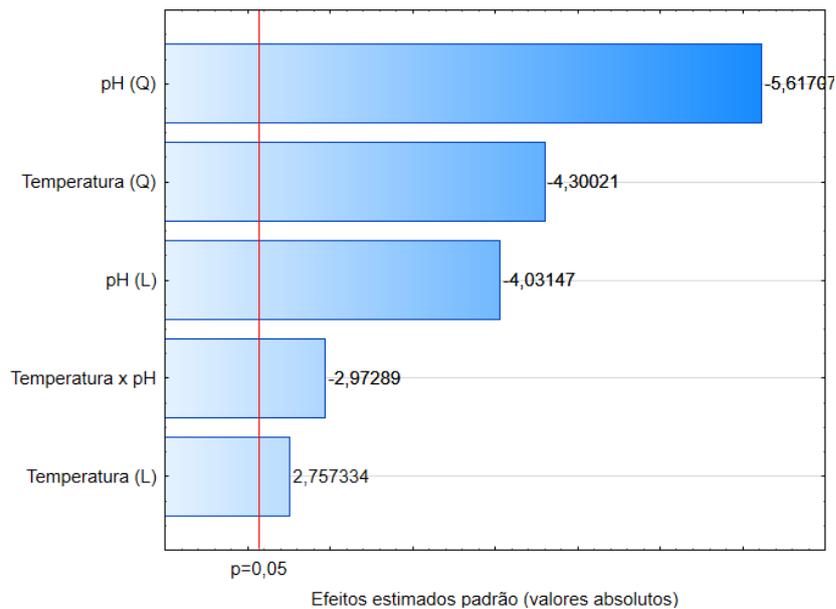


Figura 23 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH na atividade de transfrutossilção da FTase extracelular.

Fonte: do autor.

Na Tabela 13, foi apresentada a análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação aplicado para a atividade de transfrutossilção da FTase extracelular. A adequação do modelo foi avaliada por meio do coeficiente de determinação de erro (R^2). Aproximadamente 93,48 % da variabilidade das respostas observadas podem ser explicadas pelo modelo ajustado (Equação 13). Segundo Haaland (1989), valores de R^2 superiores a 90 %

são considerados muito bons. Como o coeficiente de variação explicada foi elevado e o valor tabelado de F para 95 % de confiança foi de 5,05, inferior aos 14,303 obtidos com o modelo, foi possível afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo apresentou-se maior que a variação não explicada, portanto, o modelo foi considerado válido.

Tabela 13 - Resultados da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade de transfrutossilção para a FTase extracelular

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Modelo	237,649	5	47,53	14,303
Resíduos	16,6146	5	3,32	
Falta de Ajuste	15,7058	3		
Erro Puro	0,8216	2		
Total	254,2636	10		

R² = 0,93482 F_{5;5;0,05} = 5,05

Fonte: do autor.

O modelo de regressão desenvolvido foi então representado por meio de uma superfície de resposta (Figura 24.A) e por suas curvas de contorno (Figura 24.B), visando analisar as interações entre as duas variáveis na resposta e obter, portanto, uma zona ótima, em que elevados valores de atividade de transfrutossilção são obtidos. Pelas superfície e curva obtidas, observou-se a formação de uma zona ótima entre as temperaturas de 45 °C e 50 °C e pH entre 5,5 e 6,75.

Ressalta-se que os resultados obtidos pelo planejamento experimental descreveram coerentemente o comportamento das atividades enzimáticas quando avaliadas, isoladamente, sob a influência do pH (tópico 5.2.1) e da temperatura (tópico 5.2.2).

Enquanto os resultados do presente trabalho indicaram que o aumento da temperatura e do pH do meio reacional foram significativos, Cuervo-Fernandez et al. (2007) reportaram que, para as mesmas faixas de pH e temperatura estudadas, apenas o aumento de pH (5,5 para 8,0) foi significativo nos estudos de otimização, obtendo-se ganhos expressivos de atividades de transfrutossilção.

Os efeitos da temperatura e pH do meio reacional na quantificação das atividades hidrolíticas da FTase extracelular (A_h^{extra}) também foram avaliados. Conforme as condições utilizadas no processo (TABELA 11), os valores de A_h^{extra} variaram entre 0,65 U.mL⁻¹ a 10,15 U.mL⁻¹, com valores muito próximos nos pontos centrais, representando boa repetibilidade do

processo. Cabe ressaltar que, grande parte da atividade hidrolítica é oriunda da ação da FFase, também produzida pelo *Aspergillus oryzae* IPT-301 (GANAIE et al., 2014).

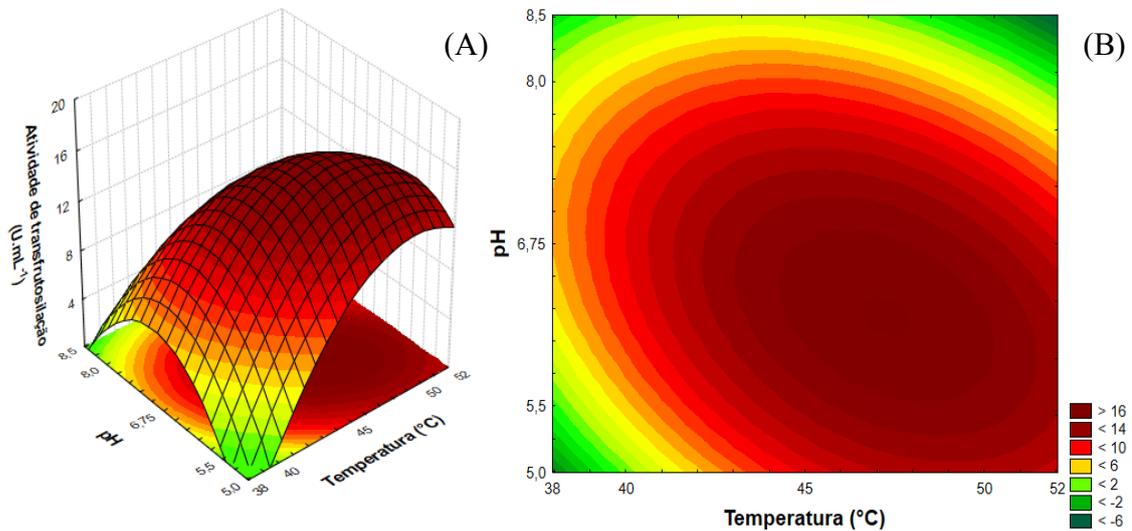


Figura 24 - (A) Superfície de resposta para a atividade de transfrutossilação extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático; (B) Curvas de contorno para a atividade de transfrutossilação extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático.

Fonte: do autor.

Por meio dos resultados obtidos, foram calculados os efeitos, apresentados na Tabela 14. Observou-se que o termo linear de pH (**pH (L)** em negrito – TABELA 14) não foi significativo, sendo, portanto, excluído do modelo quadrático com interação (Equação 15). O diagrama de Pareto (Figura 25) confirmou a significância estatística dos termos utilizados no modelo proposto.

$$A_h^{extra} = 0,793 - 1,573.(T) + 3,132.(T)^2 + 2,727.(pH)^2 + 2,045.(pH).(T) \quad (15)$$

em que A_h^{extra} refere-se a atividade hidrolítica extracelular ($U.mL^{-1}$). T e pH representam os valores codificados para temperatura e pH, respectivamente.

O valor de F, calculado na Equação (14), foi comparado com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência ($F_{Graus\ de\ liberdade\ do\ modelo; Graus\ de\ liberdade\ do\ desvio; Nível\ de\ significância}$). Na Tabela 15, foi apresentada a análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático com interação aplicado para a atividade hidrolítica da FTase extracelular. O ajuste das respostas experimentais ao modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação de erro (R^2) e do *Teste F*. Observou-se que o coeficiente de variação explicada ($R^2 = 0,9112$) foi elevado

e o valor tabelado de F para 95 % de confiança foi de 4,53, inferior aos 15,408 obtidos com o modelo, confirmando a sua validade.

Tabela 14 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades hidrolíticas da FTase extracelular

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	0,79333	0,720342	0,320925
temperatura (L)	-3,14745	0,882236	0,016085
temperatura (Q)	6,26417	1,050071	0,001894
pH (L)	1,25081	0,882236	0,215453
pH (Q)	5,45417	1,050071	0,003484
pH x temperatura	4,09000	1,247670	0,022000

Fonte: do autor.

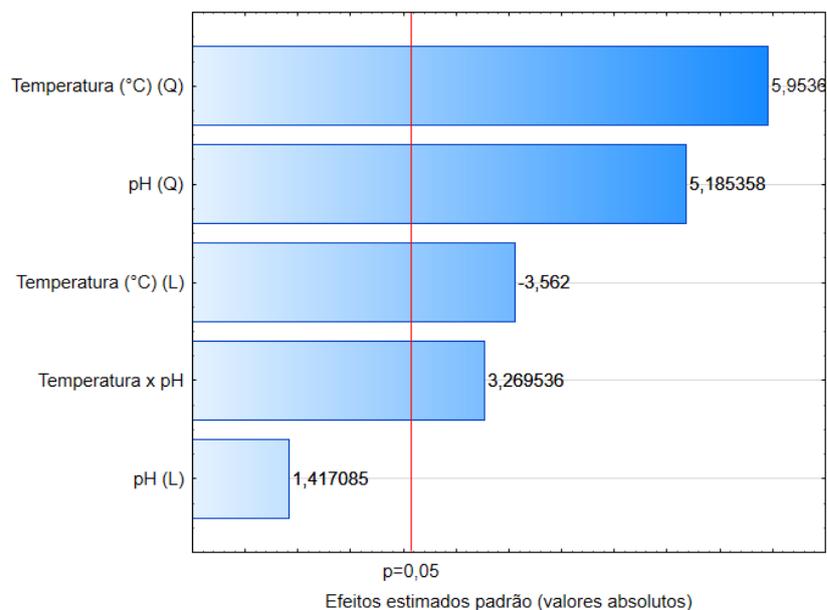


Figura 25 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH significativos na atividade hidrolíticas da FTase extracelular.

Fonte: do autor.

O modelo desenvolvido foi então representado por meio de uma superfície de resposta (Figura 26.A) e pelas curvas de contorno (Figura 26.B), visando analisar as interações entre as duas variáveis dependentes na resposta e obter, portanto, uma zona ótima, em que baixos valores de atividade hidrolíticas são atingidos, resultando consequentemente, na produção de FOS com elevados rendimentos devido ao impedimento da clivagem das moléculas do açúcar com alto grau de polimerização. Pelas superfícies e curvas obtidas, observou-se a formação de uma zona ótima entre as temperaturas de 45 °C e 48 °C e pH entre 6,0 e 7,0.

Tabela 15 - Resultados da análise de variância para o modelo quadrático com interação para a avaliação dos efeitos de temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade hidrolítica para a FTase extracelular.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Modelo	112,0986	4	28,02	15,408
Resíduos	10,9125	6	1,82	
Falta de Ajuste	10,8336	4		
Erro Puro	0,0789	2		
Total	123,0111	10		

R² = 0,9112 F_{4;6;0,05} = 4,53

Fonte: do autor.

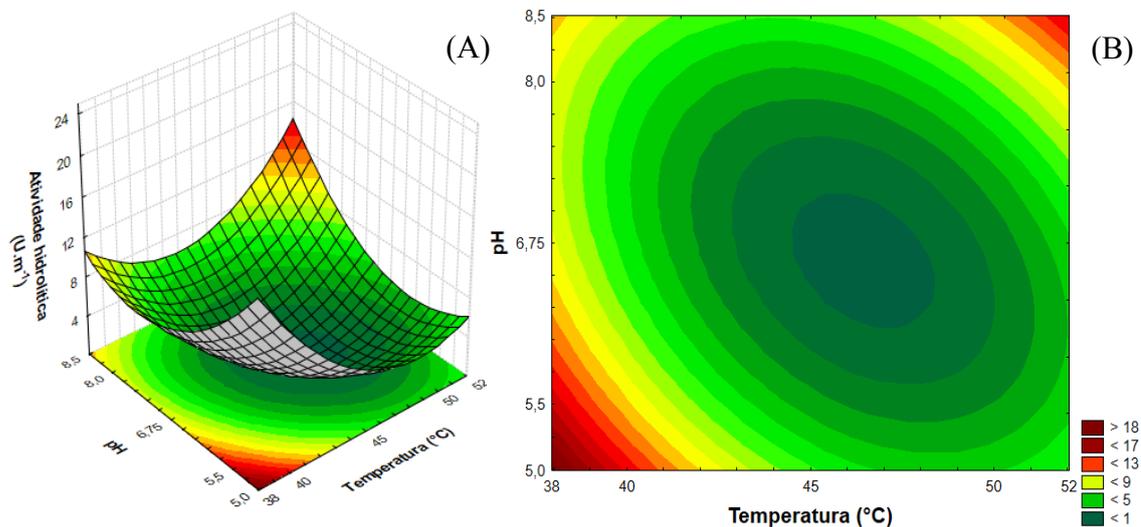


Figura 26 - (A) Superfície de resposta para a atividade hidrolítica extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional enzimático; (B) Curvas de contorno para a atividade hidrolítica extracelular em função do pH e temperatura do meio reacional.

Fonte: do autor.

Os efeitos do pH e da temperatura do meio reacional enzimático nas atividades da FTase micelial também foram avaliados. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional do tipo 2², sendo que os níveis codificados e as respostas encontram-se na Tabela 16. A temperatura e o pH do meio reacional foram definidas como as variáveis independentes, ao passo que as atividades de transfrutossilação e hidrolítica selecionadas como variáveis dependentes deste estudo. As atividades de transfrutossilação (A_t^{micelial}) variaram de 22,99 U.g⁻¹ a 333,88 U.g⁻¹, enquanto que as atividades hidrolíticas (A_h^{micelial}) variaram de 28,63

$U.g^{-1}$ a $106,40 U.g^{-1}$. As respostas $A_t^{micelial}$ obtidas foram tratadas estatisticamente e, posteriormente, os efeitos da temperatura e pH do meio reacional foram quantificados.

Tabela 16 - Matriz do delineamento e respostas para a otimização da FTase micelial produzida em 64 h de fermentação com atividades medidas em $470,6 g.L^{-1}$ de concentração de sacarose.

Valores Codificados (reais)		Atividades Miceliais	
Temperatura (°C)	pH	Transfrutossilação (U.g ⁻¹)	Hidrolítica (U.g ⁻¹)
-1 (40)	-1 (5,5)	82,62	106,40
1 (50)	-1 (5,5)	333,88	81,17
-1 (40)	1 (8,0)	142,39	44,00
1 (50)	1 (8,0)	22,99	31,98
-1,414 (38)	0 (6,75)	31,59	28,63
1,414 (52)	0 (6,75)	222,16	40,45
0 (45)	-1,414 (5,0)	128,99	67,91
0 (45)	1,414 (8,5)	39,22	42,03
0 (45)	0 (6,75)	214,50	58,63
0 (45)	0 (6,75)	193,02	40,68
0 (45)	0 (6,75)	202,58	31,11

Fonte: do autor.

Na Tabela 17 estão dispostos os efeitos dos componentes da regressão sendo que em intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$), todos foram significativos, exceto o termo de temperatura quadrática (temperatura (Q) em negrito– Tabela 17), sendo possível avaliar um modelo para a atividade enzimática (Equação 16). O diagrama de Pareto (Figura 27) corrobora a respeito da significância dos termos utilizados na construção do modelo quadrático com interação.

$$A_t^{micelial} = 203,366 + 50,170.(T) - 28,250.(T)^2 - 47,259.(pH) - 49,635.(pH)^2 - 92,665.(pH.T) \quad (16)$$

em que $A_t^{micelial}$ refere-se a atividade de transfrutossilação micelial ($U.g^{-1}$). T e pH representam os valores codificados para temperatura e pH do meio reacional enzimático, respectivamente.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático com interação aplicado para a atividade de transfrutossilação micelial em função da temperatura e pH do meio reacional (TABELA 18). A tabela mostra os resultados do *Teste F*, em que o valor de F

calculado deve ser superior ao valor de F tabelado pré-determinado, em intervalo de confiança de 95 %, para que os modelos matemáticos sejam satisfatórios.

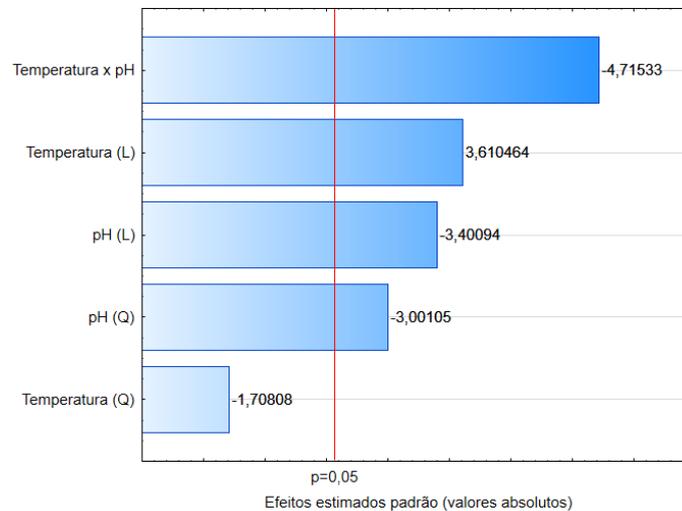


Figura 27 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH significativos na atividade de transfrutossilção da FTase micelial.

Fonte: do autor.

Tabela 17 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH nas atividades de transfrutossilção da FTase micelial.

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	203,367	22,69200	0,000288
temperatura (L)	100,342	27,79191	0,015373
temperatura (Q)	-56,502	33,07899	0,148323
pH (L)	-94,518	27,79191	0,019232
pH (Q)	-99,272	33,07899	0,030063
pH x temperatura	-185,330	39,30369	0,005264

Fonte: do autor.

O valor tabelado de F para 95 % de confiança foi de 5,05, inferior aos 11,317 obtidos com o modelo. Outro parâmetro analisado foi o coeficiente de variação (R^2), cujo valor foi igual a 0,9187, afirmando que 91,87% da variação total para a resposta atividade enzimática deveu-se a atribuição do modelo matemático. O resultado da análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo quadrático com interação desenvolvido (Equação 16) foi adequado para a predição da atividade de transfrutossilção micelial, sendo tal representado pela superfície de resposta (Figura 28.A) assim como as suas respectivas curvas de contorno (Figura 28.B).

Tabela 18 - Resultados da ANOVA para o modelo quadrático com interação descrito pelos efeitos de temperatura e pH na atividade de transfrutossilção da FTase micelial

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}
Modelo	87414,47	5	17482,89	11,317
Resíduos	7723,90	5	1544,78	
Falta de Ajuste	7492,28	3		
Erro Puro	231,62	2		
Total	95138,37	10		

$$R^2 = 0,9187 \quad F_{5;5;0,05} = 5,05$$

Fonte: do autor.

Observou-se a obtenção de elevados valores de A_t^{micelial} (valores superiores a 260,00 $U.g^{-1}$) em faixas ácidas abaixo de pH 6,5 e em temperaturas acima de 46 °C, em concordância com os estudos realizados nos tópicos 5.2.1 e 5.2.2. No trabalho de Silva (2009), verificou-se a presença de zona ótima para faixas de pH (4,8 - 5,2) e temperatura (54 - 57 °C) quando atividades de FTases produzidas por *Penicillium* sp. foram avaliadas por planejamento experimental.

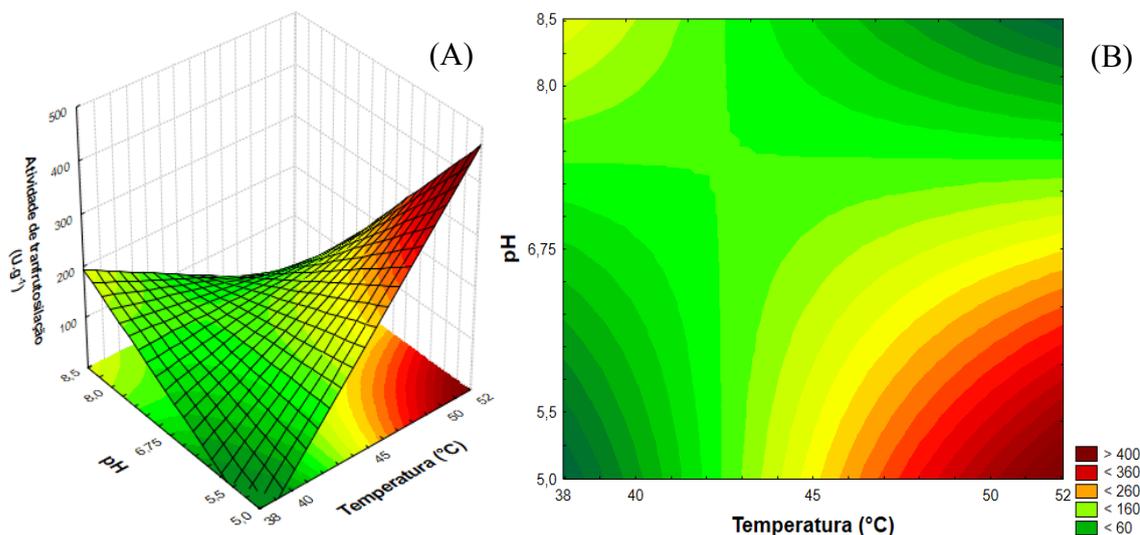


Figura 28 - (A) Superfície de resposta para a atividade de transfrutossilção micelial em função do pH e temperatura do meio reacional; (B) Curvas de contorno para a atividade de transfrutossilção micelial em função do pH e temperatura do meio reacional.

Fonte: do autor.

Os resultados para as atividades hidrolíticas miceliais (A_h^{micelial}) estão dispostos na Tabela 16. Observou-se que os valores de A_h^{micelial} variaram de 28,63 $U.g^{-1}$ a 106,40 $U.g^{-1}$.

A elevada variação dos valores obtidos, mesmo nos pontos centrais em que se esperava uma boa repetição buscando reduzir os erros, refletiu diretamente nos efeitos calculados e nas suas respectivas significâncias, em que nenhum dos termos calculados, exceto a média (em negrito na Tabela 19), foram significativos a um nível de significância de 5,0 % (TABELA 19). Tal fato pode ser claramente visualizado no diagrama de Pareto (Figura 29).

Desta forma, não foi possível a geração de um modelo que explique a variação da atividade hidrolítica micelial em função do pH e da temperatura do meio reacional enzimático.

Tabela 19 - Efeitos estimados, erro padrão e p-valor para avaliação dos efeitos de temperatura e pH na atividade hidrolítica da FTase micelial

Variáveis	Efeitos Estimados	Erro Padrão	p-valor
Média	43,4676	12,51806	0,017795
temperatura (L)	-5,1342	15,33143	0,751339
temperatura (Q)	1,6398	18,24805	0,932171
pH (L)	-37,0511	15,33143	0,060382
pH (Q)	22,0743	18,24805	0,280689
pH x temperatura	6,6017	21,68191	0,772918

Fonte: do autor.

Os resultados obtidos pelo planejamento experimental do tipo composto central rotacional 2² confirma o dados obtidos ao variarmos apenas um fator por vez (pH e temperatura)

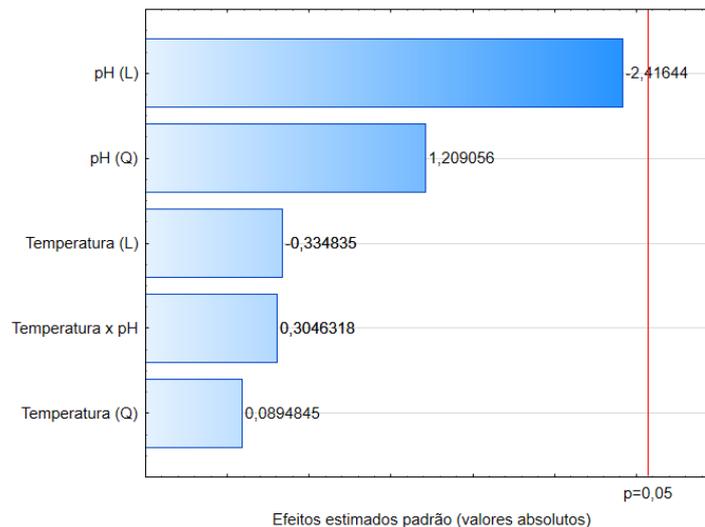


Figura 29 - Diagrama de Pareto das magnitudes dos efeitos padrão da temperatura e pH do meio reacional enzimático na atividade hidrolítica da FTase micelial.

Fonte: do autor.

6 CONCLUSÕES

De acordo com o presente trabalho, concluiu-se que os objetivos propostos foram alcançados com sucesso tanto para a construção da curva de crescimento microbiana quanto para os estudos dos efeitos de pH, temperatura e concentração de substrato do meio reacional nas atividades hidrolítica e, principalmente, de transfrutossilagem das FTases micelial e extracelular.

A concentração máxima de biomassa celular obtida para o fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301 foi de $9,35 \pm 1,26 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 h de fermentação, sendo que em 76 h, houve a produção de $7,51 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$, período em que ocorreu a acidificação do caldo fermentado (pH 4,82). As condições nas quais a enzima extracelular apresentou máxima atividade de transfrutossilagem foi aquela produzida em 64 h de fermentação, incubada na faixa de pH 4,5-6,0, temperatura reacional de 50 °C, concentração de sacarose a partir de 296,0 g.L^{-1} , apresentando estabilidade entre 30 e 35 °C e em pH 6,0. Por outro lado, a FTase micelial apresentou máxima atividade quando produzida em 72 h de fermentação, incubada na faixa de pH 4,5-6,0, temperatura reacional entre 45-55 °C, concentração de substrato igual a 470,6 g.L^{-1} , indicando estabilidade para faixas de pH (6,0-8,0) e temperatura (30-40 °C).

Ressalta-se ainda que a FTase extracelular apresentou cinética michaeliana em relação à concentração de substrato, exibindo valores de V_{\max} igual a 16,23 U.mL^{-1} e K_m de 50,41 g.L^{-1} , enquanto a FTase micelial ajustou-se ao modelo cooperativo de Hill, cujos valores dos parâmetros V_{\max} , $K_{0,5}$ e n obtidos foram iguais a 342,23 U.g^{-1} e 234,73 g.L^{-1} e 1,41, respectivamente.

O estudo da influência do tempo e da temperatura reacional na síntese de FOS mostrou que a concentração deste aumentou de forma linear em todas as temperaturas estudadas, exceto quando a FTase micelial foi incubada a 60 °C. O máximo de FOS produzido ocorreu nas temperaturas de 50 °C e 40 °C para as FTases extracelular e micelial, respectivamente.

Com relação à otimização do processo para a obtenção de FOS, ficou comprovado que a zona ótima da FTase extracelular (em que elevada atividade de transfrutossilagem e baixa atividade hidrolítica são esperadas) ocorreu nas faixas de temperatura entre 45-50 °C e de pH entre 5,5-6,75. Já para a FTase micelial, apenas a atividade de transfrutossilagem ajustou-se satisfatoriamente ao modelo quadrático com interação, cuja zona ótima ocorreu em temperaturas inferiores a 46 °C e em valores de pH inferiores a 6,5.

Finalizando, pode-se afirmar que o microrganismo utilizado no presente trabalho se destacou como fonte produtora de FTases extracelular e micelial e, estas, por sua vez, mostraram-se promissoras para a obtenção de FOS em escala laboratorial.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade deste trabalho. São elas:

- a) Estudar a imobilização da enzima FTase em diferentes suportes, com objetivo de reter maior atividade de transfrutossilacção e por mais tempo;
- b) Caracterizar bioquímica e morfológicamente a FTase imobilizada, comparando assim com os resultados obtidos para a enzima livre e executar estudos de caracterização FTase de *Aspergillus oryzae* IPT-301 e quanto ao seu peso molecular e possivelmente sua estrutura tridimensional, e o tipo de interação que esta possui com o micélio;
- c) Realizar fermentações em bateladas alimentadas visando aumentar a produtividade do processo;
- d) Avaliar a influência da aeração durante a fermentação e seus efeitos na produtividade da enzima;
- e) Desenvolver técnicas de recuperação e purificação da FTase oriunda do *Aspergillus oryzae* IPT-301, microorganismo também produtor de β -frutofuranosidase, enzima também responsável pela hidrólise dos FOS em baixas concentrações de sacarose em meio reacional.
- f) Avaliar a produção da FTase em meios de cultivo constituídos por subprodutos agroindustriais, reduzindo assim os custos com o processo;
- g) Avaliar o desempenho da enzima imobilizada em reatores de leito fixo ou do tipo *air lift*;
- h) Devido a esta enzima apresentar elevado potencial para aplicação industrial, sugere-se estudar o aumento de escala para a síntese de FOS.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.A. et al. Screening β -fructofuranosidases mutant libraries to enhance the transglycosylation rates of β -(2 \rightarrow 6) fructooligosaccharides. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.14, p. 730–738, 2011.
- ALMEIDA A. C. S. et al. Sucrose hydrolysis catalyzed by autoimmobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8.,2005.
- ANDERSEN, B. The transferring activity of β -fructofuranosidase: formation of two disaccharides from fructose. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 21, p. 828, 1967.
- ANDERSSON, H.B., ELLEGARD L.H., BOSAEUS, I.G. Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1428S–1430S, 1999.
- ANTOŠOVÁ, M.; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers—Chemické Zvesti**, v. 55, p. 350–358, 2001.
- ANTOŠOVÁ, M. et al. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 58–63. 2008.
- ANVISA. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas>> Acesso em: 14 set. 2016.
- ANWAR, M.A. et al. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74 p. 3426-3433, 2008.
- BACON, J.S.D; EDELMAN, J. The action of invertase preparation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.28, p. 267-468, 1950.
- BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Química dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Brasília, 1999.
- BRENDA. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. **Information on E.C 2.4.1.9**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.9>>. Acesso em: 28 ago. 2016.
- _____. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. **Information on E.C 3.2.1.26**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.26>>. Acesso em: 28 ago. 2016.
- CAIRNS, A.J. Evidence for de novo synthesis of fructan by enzymes from higher plants, a reappraisal of the SST/FFT model. **New Phytology**, v.123, p.15–24,1993.

- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. Protease form *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolases with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v. 2014, 2014.
- CHANG, C.T. et al. Purification and properties of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 32, n. 2, p. 269-277, 1994.
- CHAPLIN, M; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- CHEN, C. et al. Cloning, expression and functional validation of a β -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum*. **Process Biochemistry**, v.49. p. 758-767, 2014.
- CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**,v. 18. P 153-160, 1996.
- CHI, Z. et al. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, p.211–220, 2009.
- CHIEN, C.S; LEE,W.C; LIN, T.J. Immobilization of *A. japonicas* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme Microbiology Technology**, v.29. p.252-257, 2001.
- CHO, Y. J.; YUN, J. W. Purification and characterization of endoinulinase from *Xanthomonas oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1325–1331, 2002.
- CREDENCE RESEARCH. **Fructooligosaccharides (FOS) Market By Application (Food & Beverage, Dietary Supplements, Animal Feed and Pet Food) - Growth, Share, Opportunities & Competitive Analysis, 2015-2022**. 2016. Disponível em: <<http://www.credenceresearch.com/report/fructooligosaccharides-fos-market>>. Acesso em 25 mai. 2017.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of foodgrade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.353–360, 1996.
- CUERVO-FERNANDEZ, R. et al. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.268-272, 2004.
- _____. Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.87-93, 2007.
- DOMINGUES, A. L. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. **Food Bioprocess and Technology**, v. 7, n. 324, 2014.
- DUAN, K.J., CHEN, J.S., SHEU, D.C. Kinetics studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.334–339, 1994.
- EGGLESTON, G., CÔTÉ, G.L. **Oligosaccharides in food and agriculture**. In: Eggleston Côté GL, eds. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC.; 2003, chapter 1:1–14.

- FELTRE, R. **Química**, v. 2. São Paulo: Moderna, 2005.
- FENG, H.Y. et al. Converting a β -glycosidase into a β -transglycosidase by directed evolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.37088–37097, 2005.
- FORTES, R.C; MUNIZ, L.B. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v.20, n.3, p.241-252, 2009.
- FORTES, R.C. Os frutooligosacarídeos, a inulina e suas implicações na indústria de alimentos. **Nutrição Brasil**, v.4. n.1, p.52-61, 2006.
- FUJITA, K. et al. Transfructosilation catalized by β -fructofuranosidase from *Arthrobacter sp.* K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, n.10, p.2655-2661, 1990.
- GANAI, M.A.; LATEEF, A.; GUPTA, U.S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.172, p. 2143-2159, 2014.
- GANAI, M.A.; GUPTA, U.S. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.110. p. 253-258. 2014.
- GHAZI, I. et al. Beet sugar and molasses as low cost feedstock for the enzymatic production of fructooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2964–2968, 2006.
- GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.1, p. 204-211, 2005.
- GIRALDO, M.A. et al. Characterization of the co-purified invertase and beta-glucosidase of a multifunctional extract from *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30. p.1501-1510, 2014.
- GOTO, K. et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59. n.12. p.2346-2347, 1995.
- HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Decker, 1989.
- HAYASHI, S. et al. Production of a fructosyl-transfering enzyme by *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v.5, p.395-400, 1990.
- HARTEMINK, R.; VAN LAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 367-374, 1997.
- HEBETTE, C.L.M. et al. Complex melting of semicrystalline chicory (*Cichorium intybus L.*) root inulin. **Carbohydrate Research**, v. 310. p.65–75, 1998.
- HESTRIN, S.; FEINGOLD, D.; SCHRAMM, M. Hexoside hydrolases. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 231–257, 1955.
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 184 f. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

- HIDAKA, H. Fructooligosaccharides. In: **The amylase research Society of Japan (ed) Handbook of amylases and related enzymes**. Pergamon, 1988.
- HIDAKA, H., HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52. p.1181–1187,1988.
- HIDAKA, H. et al Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v.5 p.37–50. 1986.
- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53. n.3. p. 667-673, 1989.
- HUALLANCO, M.B.A. **Modelagem cinética e simulação de processo de produção de fructooligosaccharídeos por frutotransferase de *Rhodotorula* sp. livre e imobilizada**. 193 f. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **ExploEnz**. Disponível em: <<http://www.enzyme-database.org/>> Acesso em 30 ago. 2016.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- JOHANNES, T. et al. Biocatalysts. In: LEE, S.**Encyclopedia of chemical processing**. Taylor & Francis, 2006.
- JUNG, K.H. et al. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p. 491–494, 1989.
- KATAPODIS, P. et al. Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 378–382, 2004.
- KHAWARE, R.K.; KOUL, A.; PRASAD, R. High membrane fluidity is related to NaCl stress in *Candida membranefaciens*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.35, p.875–880, 1995.
- KIM, B.W. et al. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.11–16, 2000.
- KOOPS, A.J.; JONKER.; H.H. **Plant physiology**, v. 110, p. 1167, 1996.
- KORIR, A. K.; LARIVE, C. K. On line NMR detection of microgram quantities of heparin derived oligosaccharides and their structure elucidation by microcoil NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1707–1716, 2007.
- KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 236-239, 1996.
- KURAKAKE, M. et al. Production of fructooligosaccharides by beta-fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 488-492, 2010.

- LATEEF, A.; OLOKE, J.K.; PRAPULLA, S.G. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1067–1070, 2007.
- LEE, J.H.; SHINOHARA, S. Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructooligosaccharides from Sucrose Using *Penicillium citrinum* Cells. **The Journal of Microbiology**, v.39, n.4, p.331–333, 2001.
- LEWIS, D.H. Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans a paper for discussion. **New Phytology**, v.124, p.583–594, 1993.
- LI, J. et al. Determination of Fructooligosaccharides in Burdock Using HPLC and Microwave-Assisted Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.5888–5892, 2013.
- L'HOCINE, L. et al. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. **Journal of Biotechnology**, v.81, n. 1, p.73-84, 2000.
- LÜSCHER, M. et al. Isolation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from barley (*Hordeum vulgare*). **New Phytology**, v.145, p. 225–232, 2000.
- LUSCHER, M. et al. **FEBS letters**, v.385, p. 39. 1996.
- MADLOVÁ, A. et al. Thermal stability of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemical Papers**, v.54, p.339-344, 2000.
- MAIORANO, A.E. et al. Influence of the culture medium on the fructosyltransferase production. **New Biotechnology**, v. 25 S, p. 201, 2009.
- _____. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, v.30. p.1867-1877, 2008.
- MALDONADI, I.R; CARVALHO, P.G.B; FERREIRA, N.A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS**. Brasília: EMBRAPA, 2013.
- MARX, S.P. et al. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p.163–169, 2000.
- MABEL, M. J. et al. Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 56–66, 2008.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030
- MONSAN, P., PAUL, F., Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology**, v. 16, p. 187–192, 1995.
- MORDOR INTELLIGENCE. **Global nutraceuticals market - growth, trends and forecasts (2017 - 2022)**. Mordor Intelligence. Abril de 2017. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nutraceuticals-market-industry?gclid=CjsKDwjw6qnJBRDpoonDwLSeZhIkAlpTR8Lv0J0UzcsFD-TDSowPYe15cIf211hTNGZ5NW-D1GLKGgJKzPD_BwE>. Acesso em 20 de mai de 2017.
- MUNJAL, U. et al. Fermentation products of inulin-types fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of diferente stages of carcinogenesis. **British Journal of Nutrition**, v.27, p.1-9, 2009.

- MUTANDA, T. et al. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recente advances and current perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p.893–906, 2014.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.
- NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1245-1251, 2002.
- NINESS K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v.129, p.1402S–1406S,1999.
- NING, Y. et al. Low cost production od neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource technology**, v.101, p.7472-7478, 2010.
- NGUYEN, Q.D. et al. Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *A. niger* IMI 303386. **Biotechnology Letters**, v. 21. p.183–186, 1999.
- OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligosacarídeos**. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.
- OTTONI, C.A. et al. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, ed. 1, p.49-59,2012.
- PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33, p.385-390, 2003.
- POOL-SOBEL, B.L.; SAUER, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal câncer risk by inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. S2580-S2584, 2007.
- REECE, J. B. **Campbell biology**. 10. ed. San Francisco: Benjamin Cummins, 2013.
- REHM, J.; WILLMITZER, L.; HEYER, A.G. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p.1305-10, 1998
- RICCA, E. et al. Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: a kinetic study and reaction mechanism. **Process Biochemistry**, v.44, p. 466–470, 2009.
- RIVERO-URGEL, M., SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**. v. 65, p. S43–S52, 2001.
- ROBERFROID, M.B. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, v.137 (sup 3), p.S 830-S837, 2007.
- ROBERFROID, M.B. et al. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, p. 11-19, 1998.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SANGEETHA, P.T. et al. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v.40 p.1085–1088, 2005.

SANTOS-MORIANO, P. et al. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using levansucrase from *Zymomonas mobilis*: effect of reaction conditions. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, n.119, p. 18-25, 2015.

SAULNIER, D.M. et al. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1753–65, 2007.

SCHUURMANN, J. et al. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, 8031-8046, 2014.

SHEU, D. et al. Production of high-purity neofructooligosaccharides by culture of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 132, p.432–435, 2013.

SHULER, M.L. **Bioprocess engineering: basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.

SILVA, J.C. **Seleção de microrganismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium* sp.** 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2009.

SOMIARI, R.I.; BIELECKI, S. Effect of fructose and glucose supplementation on invertase mediated synthesis of oligosaccharides from sucrose. **Biotechnology Letters**, v.17, n.5, p. 519-524, 1995.

SPIEGEL, J. E. et al. Safety and benefit of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.1, p.85-89, 1994.

ST. JOHN, J. A. et al. Synthesis of fructans by partially purified fructosyltransferase activities from *Lolium rigidum*. **New Phytologist**, v. 136, p. 39–51, 1997.

TAKEDA, H. et al. Production of 1-kestose by *Scopularius brevicaulis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77. p.386-389, 1994.

TSUJITA, Y.; ENDO, A. Extracellular acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on liquid media: multiple forms and association with heterogeneous polysaccharides. **Journal of Bacteriology**. p. 48-56. 1997.

TROLLOPE, K.M. et al. Direct, simultaneous quantification of fructooligosaccharides by FT-MIR ATR spectroscopy and chemometrics for rapid identification of superior, engineered β -fructofuranosidases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.407, p. 1661–1671, 2015.

VAN HIJUM, S.A.; VAN DER MAAREL, M.J.; DIJKHUIZEN, L. Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. **FEBS Letters**, v.534. p.207-210, 2003.

VEGA, R.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.102, p.10180–10186, 2011.

VIGANTS, A. et al. An influence of ethanol and temperature on products formation by different preparations of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Folia Microbiologica**, v. 58, p.75–80, 2013.

WANG, T. Synthesis of neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, v.5, p. 1-6, 2015.

WEISS, J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **FASEB Journal**, v.11, n. 11, p. 835-841, 1997.

WONG, C.M.; WONG, K.H.; CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4

XU, Q. et al. Purification and biochemical characterization of a novel fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v.50, p. 1237–1246. 2015.

YAZAWA, K; TAMURA, Z. Search for sugars sources for selective increase of bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora**, v.1, p. 39-44, 1982.

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

YUN, J.W. et al. Semi-batch production of fructo-oligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.24/25, p. 299–308, 1990.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Curvas analíticas

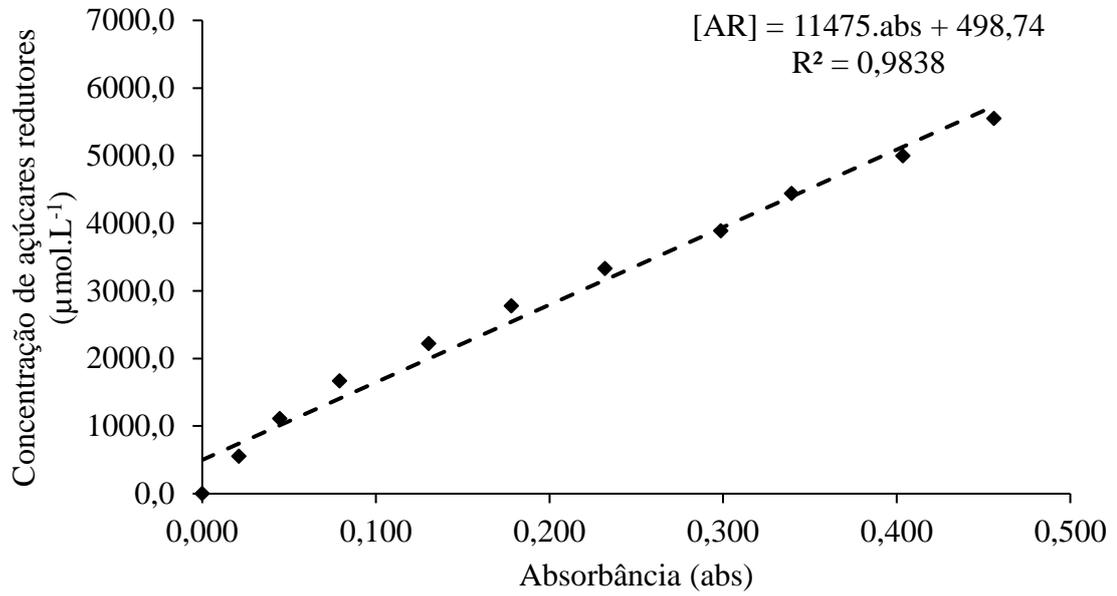


Figura 30 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores.

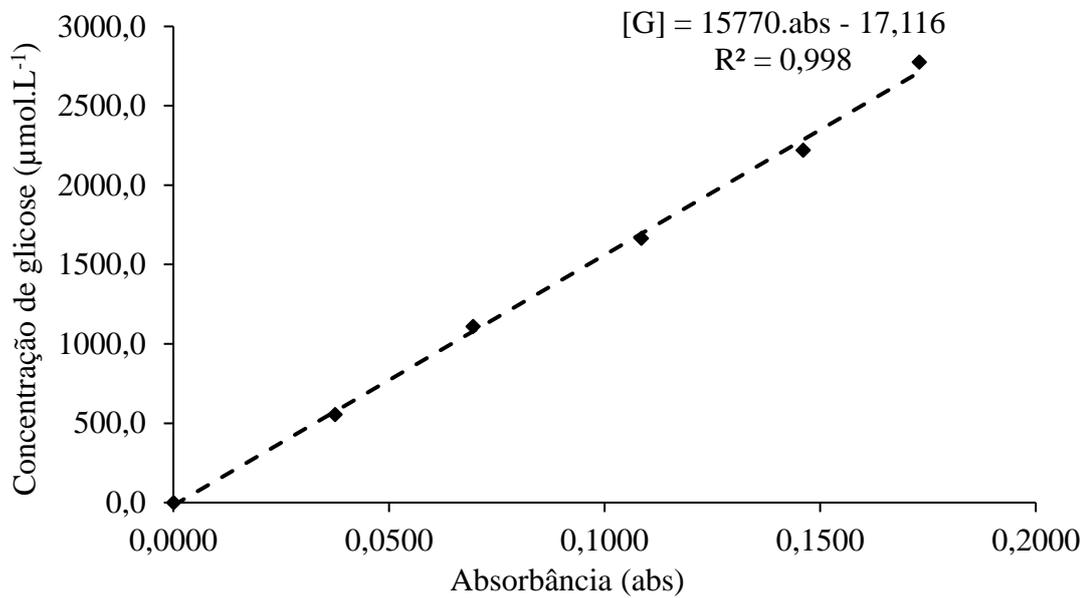


Figura 31 - Curva analítica do método GOD - PAP para determinação de glicose.