

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL
CAMPUS POÇOS DE CALDAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

MARCELA FERNANDES DE OLIVEIRA

**SEPARAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR
Aspergillus oryzae IPT 301 EM UMA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA**

Poços de Caldas/MG
2018

MARCELA FERNANDES DE OLIVEIRA

**SEPARAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE PRODUZIDA POR
ASPERGILLUS ORYZAE IPT 301 EM UMA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Firmani Perna.

Poços de Caldas/MG
2018

O48s Oliveira, Marcela Fernandes de.

Separação da enzima frutossiltransferase produzida por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em uma coluna de bolhas e espuma / Marcela Fernandes de Oliveira. – Poços de Caldas/MG, 2018.
83 f. –

Orientador(a): Rodrigo Corrêa Basso.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2018.
Bibliografia.

1. Fermentação. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. Análise enzimática. I. Basso, Rodrigo Corrêa. II. Título.

CDD – 660

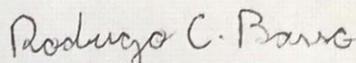
MARCELA FERNANDES DE OLIVEIRA

**SEPARAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE PRODUZIDA
POR *ASPERGILLUS ORIZAE* IPT-301 EM UMA COLUNA DE BOLHAS
E ESPUMA**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

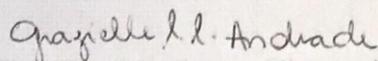
Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 14 de maio de 2018.



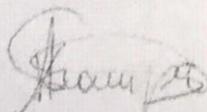
Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Profa. Dra. Grazielle Santos Silva Andrade

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Profa. Dra. Klicia Araújo Sampaio

Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela constante presença, força, proporcionando sabedoria e conhecimento para a realização de mais esta etapa da minha vida.

Aos meus familiares, por todo suporte e nunca me deixar desistir.

Ao meu orientador Rodrigo Corrêa Basso, por toda paciência, profissionalismo, colaboração, auxílio e aprendizado, os quais foram indispensáveis na execução deste trabalho.

Ao coorientador Rafael Firmani Perna por todo suporte e colaboração para este trabalho. Pelos conselhos, ensinamentos e sábias palavras nos momentos de dúvidas.

Aos integrantes do LBP (Laboratório de Bioprocessos) que sempre me auxiliaram na parte prática quanto em dúvidas e questionamentos, principalmente ao mestre Josivan, aos mestrandos Rogério e Maria Carolina e a aluna de IC Geisa que me auxiliaram nesse caminho.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios da Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas, pela assistência em todos os momentos.

A todos os professores que, durante todo o período de pós-graduação, contribuíram com seus ensinamentos.

Aos amigos do mestrado, pelos conhecimentos compartilhados, amizades e apoio nos momentos felizes e também nos momentos difíceis.

Aos grandes amigos que mesmo longe sempre estiveram presente e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

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

Enfim, a todos, o meu muito obrigada!

*“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que a fez tão importante...”*

(ANTOINE SAINT-EXUPÉRY)

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são açúcares com importantes propriedades funcionais. Eles são catalisados por reações de hidrólise da inulina ou por meio da reação de transfrutossililação a partir da sacarose. A enzima responsável pela formação de FOS a partir da sacarose é a frutossiltransferase. Industrialmente esta enzima é obtida a partir de micro-organismos, dentre eles alguns tipos de fungos como os do gênero *Aureobasidium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. A produção de FOS utilizando-se da enzima, ao invés do processo fermentativo realizado pelo micro-organismo, permite que sejam utilizadas as condições ótimas de catálise deste biocatalisador. Diante da crescente demanda por FOS, o desenvolvimento de tecnologia nacional voltada à separação e recuperação da enzima frutossiltransferase é de grande importância. Deste modo, esse trabalho tem por objetivo a recuperação da enzima frutossiltransferase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301. Para isso, o processo de separação foi realizado em uma coluna de bolhas e espuma, para a qual foram estudados pH, diluição do meio e concentração do surfactante Tween 80® adicionado. A capacidade de formação de espuma para a realização do processo foi obtida pela adição de concentrações entre 0,5 e 2% (m/v) de Tween 80®. Os resultados de atividade enzimática indicaram que a concentração de 1% (m/v) de Tween 80® adicionado após a fermentação provocaram aumento na atividade de transfrutossililação (A_t) e redução da atividade hidrolítica (A_h), atingindo valores de 22,47 e 1,60 U.mL⁻¹. Os ensaios na coluna de bolhas e espuma indicaram que utilização de 0,5% e 1,5% (m/v) de surfactante ao caldo fermentado com diluição 1:2 e sem diluição, respectivamente, em pH 5,5 atingiram melhores resultados. O método Dumas, para determinação de proteínas, mostrou-se inadequado para a determinação da concentração de enzimas nos sistemas estudados, muito provavelmente devido a concentração destas ser inferior ao limite de quantificação do equipamento.

Palavras-chave: Frutossiltransferase. Coluna de bolhas e espuma. Processo de separação enzimática. Atividade de transfrutossililação

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are sugars with important functional properties. They are catalyzed by inulin hydrolysis reactions or by the transfructosylation reaction from sucrose. The enzyme responsible for the formation of FOS from sucrose is the fructosyltransferase. Industrially this enzyme is obtained from microorganisms, among them there are some types of fungi like genus *Aureobasidium*, *Penicillium* and *Aspergillus*. The production of FOS directly from the enzyme, instead of the fermentation process carried out by the microorganism, allows the use of optimum conditions of catalysis for this biocatalyst. Due to the growing national demand for FOS, the development of national technology aimed at the separation and recovery of fructosyltransferase enzyme is of a great importance. Thus, this work aims to recover the enzyme fructosyltransferase produced from the fungus *Aspergillus oryzae* IPT-301. In order to perform this study, the process was carried out in a column of bubble and foam, where the pH, dilution of medium and concentration of the surfactant Tween 80® added was carefully studied. Foaming capacity for the process was obtained by addition of concentrations between 0.5 and 2% (w/v) Tween 80®. The results of enzymatic activity indicated that the concentration of 1% (w/v) of Tween 80 added to the medium after fermentation caused an increase in the transfructosylation activity (A_t) and reduction of the hydrolytic activity (A_h), reaching values of 22.47 and 1.60 U.mL⁻¹, respectively. The bubble and foam column tests indicated that use of 0.5% and 1.5% (w/v) surfactant to fermented broth with 1:2 (v/v) dilution and without dilution, respectively, at pH 5.5 achieved better results. The Dumas method, used to determine proteins, proved to be inadequate for the determination of enzyme concentration in the studied systems, most probably due to their concentration being below the limit of quantification of the equipment.

Keywords: Fructosyltransferase. Column of bubble and foam. Process of enzymatic separation. Transfructosylation activity.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos: (A) 1-kestose (GF ₂), (B) nistose (GF ₃) e (C) frutofuranosil nistose (GF ₄).	23
Figura 2 - Estrutura química do Tween 80.	33
Figura 3 - Esquema do aparato experimental utilizado no fracionamento da FTase em coluna de bolhas e espuma.	43
Figura 4 - Coluna de bolhas e espuma.	44
Figura 5 - Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 4,5	48
Figura 6 - Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 5,5.	48
Figura 7 - Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 5,5.	49
Figura 8 - Influência da concentração de Tween 80® adicionado ao caldo fermentado na atividade enzimática.	51
Figura 9 - Influência da concentração de Tween 80® adicionado ao caldo fermentado na razão A_t/A_h	52
Figura 10 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 1	57
Figura 11 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 2	57
Figura 12 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 3	58
Figura 13 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 4	59
Figura 14 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 5	59
Figura 15 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 6	60
Figura 16 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 7	61

Figura 17 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 8	61
Figura 18 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 9	62
Figura 19 - Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 10	63
Figura 20 - Efeito da diluição nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante o pH (5,5) e a concentração de surfactante (1,5%) (m/v) e variando a diluição. Os ensaios 5, 6, 7, e 8 representam caldos sem diluição, 1:1, 1:2, 1:3 (v/v), respectivamente.....	64
Figura 21 - Efeito do pH nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante o caldo sem diluição e a concentração de surfactante (1,5%) (m/v) e variando o pH. Os ensaios 5, 9 e 10 representam pHs 5,5, 6,5 e 7,5, respectivamente..	65
Figura 22 - Efeito da concentração de surfactante nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante caldos em pH 5,5. Os ensaios 2, 4 e 5 representam concentrações de Tween 80® de 0,5%, 1,0% e 1,5%, respectivamente.....	66
Figura 23 - Efeito da concentração de surfactante nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante caldos com diluição 1:1 (v/v) em pH 5,5. Os ensaios 1, 3 e 6 representam concentrações de Tween 80® de 0,5%, 1,0% e 1,5%, respectivamente.....	67
Figura 24 - Curva analítica do método GOD-PAP para determinação de glicose.	82
Figura 25 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades da FTase produzida por diferentes micro-organismos	20
Tabela 2 - Fontes microbianas e vegetais de enzimas produtoras de oligossacarídeos.....	25
Tabela 3 - Métodos de purificação da FTase na literatura.	28
Tabela 4 - Processos de separação/purificação utilizando coluna de bolhas e espuma.....	31
Tabela 5 - Utilização de surfactantes na recuperação de atividades enzimáticas na literatura.	35
Tabela 6 - Identificação dos ensaios realizados na coluna de bolhas e espuma.....	46
Tabela 7 - Características qualitativas da espuma formada de acordo com as condições de diluição de tensoativo em pH 5,5	53
Tabela 8 - Resultados das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma utilizando 0,3% de agente espumante.....	54
Tabela 9 - Resultados das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma utilizando 0,4% de agente espumante.....	55
Tabela 10 – Concentração de proteínas totais dos ensaios realizados na coluna de bolhas e espuma	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	FOS E SAÚDE	17
3.2	PRODUÇÃO DE FOS	19
3.2.1	Atividade de transfrutoseilação (A_t) e atividade hidrolítica (A_h)	20
3.3	MERCADO DE FOS: BRASILEIRO E MUNDIAL	22
3.4	ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DE FOS	23
3.5	ENZIMAS PRODUTORAS DE OLIGOSSACARÍDEOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
3.6	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	26
3.7	COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA: PRÍNCIPIO DO PROCESSO E UTILIZAÇÃO NA SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	28
3.7.1	Leito de espuma	32
3.8	SURFACTANTES EM MOLÉCULAS NA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS E EFEITO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 E CONDIÇÕES DE CULTIVO	36
4.1.1	Meio de cultura	36
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	37
4.2.1	Determinação da Atividade Enzimática	37
4.2.1.1	Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) por DNS.....	39
4.2.1.2	Determinação da concentração de glicose pelo protocolo GOD-PAP	40
4.2.2	Determinação da capacidade de formação de espuma	41
4.2.3	Teste do efeito do Tween 80® na atividade enzimática	41
4.2.4	Quantificação de proteína total por meio do método Dumas	42
4.3	SEPARAÇÃO NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA.....	42
4.3.1	Descrição da coluna de bolhas e espuma	42
4.3.2	Teste das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma	44

4.3.3	Separação enzimática na coluna de bolhas e espuma	45
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ESTUDO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA (CFE)	47
5.2	ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TWEEN 80® NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FTASE	50
5.3	RESULTADOS PRELIMINARES DOS TESTES OPERACIONAIS NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA	53
5.3.1	Características qualitativas da espuma	53
5.3.2	Estudo das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma	54
5.4	ENSAIOS DE SEPARAÇÃO DA FTASE NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TWEEN 80®, DILUIÇÃO E pH	56
5.4.1	Monitoramento da separação da FTase em função do tempo	56
5.4.2	Separação global da FTase entre a coluna de líquido e o leito de espuma	63
5.5	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS ENSAIOS NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA.....	68
6	CONCLUSÕES	71
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A – Curvas analíticas	82
	APÊNDICE B – Resultados das quantificações de proteínas totais por meio do método Dumas	83

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população é acompanhado da preocupação de melhor qualidade de vida e uma alimentação mais saudável. Com isso, a demanda por alimentos funcionais, como prebióticos e probióticos é crescente. Os alimentos funcionais são aqueles, que além de fornecerem uma nutrição básica, também promovem a saúde por meio de mecanismos não previstos da nutrição convencional (SAAD, 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define probióticos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2006). Eles são substâncias inativadas que agem como suplemento de energia para as bactérias benéficas. Já os prebióticos são definidos como ingredientes não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon (PIRES et al., 2015).

Dentre os prebióticos mais utilizados como ingredientes funcionais têm-se os frutanos, sendo a inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) os principais desta classe. FOS é o nome comum dado aos oligômeros de frutose, os quais são prebióticos que possuem sabor semelhante ao da sacarose (FORTES; MUNIZ, 2010). De acordo com um recente relatório de pesquisa de mercado publicado pela *Credence Research* (2017), o mercado de FOS foi avaliado em US\$ 344 milhões em 2014 e há estimativa de expansão de 13,1% de 2015 até 2022.

Os FOS são amplamente utilizados em indústrias como edulcorantes, pois apresentam baixos teores calóricos, podem ser utilizados por diabéticos, diminuem níveis de colesterol e triglicerídeos e estimulam o crescimento de bifidobactérias no cólon melhorando a absorção de minerais (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2004). São encontrados naturalmente em níveis de traços em alguns vegetais, tais como cebola, alho, alcachofra de Jerusalém, aspargos, bananas, centeio, trigo e tomates. Eles também podem ser produzidos pela síntese 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). Essas enzimas são de origem vegetal e microbiana, porém o uso de enzimas microbianas é mais vantajoso, pois os micro-organismos apresentam ciclo de vida curto, baixo custo de produção da enzima e não sofrem com problemas de sazonalidade (HERNALSTEENS, 2006).

A frutossiltransferase (FTase) é a enzima que apresenta maiores rendimentos de FOS e pode ser produzida por diversos tipos de fungos como os do tipo *Aspergillus* sp.,

Aureobasidium sp. e *Penicillium* sp., entre outros (DOMINGUEZ et al., 2013). No processo industrial da síntese de FOS é requerida FTase com elevada atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica, a fim de proporcionar altos rendimentos do fruto-oligossacarídeo (CUERVO-FERNANDEZ et al., 2007; HIDAKA et al., 1988; HIDAKA et al., 1986).

Para efetuar a separação e purificação da FTase, geralmente são utilizadas técnicas complexas e de pequena escala como cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC). Porém, tais técnicas geralmente não são economicamente viáveis, principalmente quando aplicadas em escala industrial (ANTOŠOVÁ et al., 2008).

Deste modo é necessária uma nova tecnologia de separação e recuperação que seja de operação simples e viável economicamente. A separação por meio de adsorção em espuma, majoritariamente utilizada na separação de proteínas (AKZAY, 2007; BROWN; NARSINHAM; WANKAT, 1990), é uma técnica fundamentada no fenômeno de adsorção de moléculas tensoativas na interface gás-líquido (KINOSHITA et al., 2011, ZHANG et al., 2011).

Geralmente, os produtos de fermentação apresentam no meio de cultura solutos diluídos, o que dificulta a recuperação de moléculas anfifílicas as quais apresentam a característica de possuírem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica (BROWN et al., 1990). A coluna de bolhas e espuma pode ser empregada para concentrar soluções de baixas concentrações de macromoléculas biológicas, como proteínas e enzimas (GERKEN, 2006; LINKE, 2007). Além disso, apresenta bom potencial de aplicação devido a operação simples, alta eficiência e baixo consumo de energia (ZHANG et al., 2011).

A técnica baseia-se na injeção controlada de gás pela base de uma coluna. À medida que as bolhas de gás ascendem através da solução, moléculas são concentradas na interface gás-líquido e transportadas para a fase espuma que se formará quando as bolhas enriquecidas em substâncias tensoativas saem da fase líquida. Todo o processo é realizado com temperatura controlada (LUCENA, 1995).

Este processo de separação tem ampla aplicabilidade em indústrias processadoras de alimentos, fabricantes de bebidas, destilarias e, também em indústrias farmacêuticas. Essas indústrias podem beneficiar-se dessa técnica de separação, pois pode ser empregada na recuperação de proteínas, aminoácidos e peptídeos, componentes lipídicos, vitaminas e até mesmo de fibras (ROSA, 1996).

2 OBJETIVOS

Neste tópico são apresentados os objetivos geral e específicos propostos para a execução do trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi separar a enzima FTase produzida por fermentação submersa utilizando o *Aspergillus oryzae* IPT-301, empregando uma coluna de bolhas e espuma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando atingir o objetivo geral, alguns objetivos específicos foram traçados:

- a) Estudar o efeito da diluição do caldo de fermentação e do pH na formação de espuma;
- b) Avaliar a utilização de surfactante como agente espumante;
- c) Determinar as condições operacionais para o escoamento e drenagem da espuma ao longo de seu avanço na coluna;
- d) Estudar o efeito do pH na separação da enzima;
- e) Quantificar as atividades hidrolítica e de transfrutossilacção da frutossiltransferase no meio fermentativo restante na coluna de líquido e na espuma recolhida após o processo na coluna sob diferentes diluições iniciais do caldo e pH;
- f) Quantificar a concentração de proteínas totais no caldo inicial, no caldo final e na espuma originária do processo de separação;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico são apresentados características gerais dos FOS, modos de produção, importância econômica destes no cenário brasileiro e mundial e na saúde. Também são apresentados os métodos de separação e purificação da enzima FTase, dentre eles a separação desta enzima utilizando uma coluna de bolhas e espuma e os principais parâmetros que exercem influência no processo.

3.1 FOS E SAÚDE

A atenção ao envelhecimento da população está se tornando uma prioridade em relação aos hábitos de saúde global. Pela primeira vez na história, o número de pessoas com mais de 65 anos superará o número de crianças (menores de 5 anos). Isso se deve aos avanços da medicina e ao desenvolvimento socioeconômico (DUNCAN; FLINT, 2013). Deste modo, torna-se necessário desenvolver conhecimentos científicos e tecnologias que resultem em modificações importante no estilo de vida das pessoas. A nutrição é um dos modos de buscar assegurar o bem-estar e a saúde, bem como minimizar o desenvolvimento de doenças ao longo da vida (ROBERFORID, 2007).

Os alimentos funcionais são aqueles que além de fornecerem a nutrição básica, também promovem a saúde. O trato gastrointestinal possibilita o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro. Manter o equilíbrio da microbiota é importante para a saúde, o que pode ser assegurado por uma suplementação com base na dieta de probióticos e prebióticos, os quais são os aditivos alimentares que compõem os alimentos funcionais (SAAD, 2006).

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro. Os prebióticos resultam em mudanças na composição/atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS et al., 2014).

Os alimentos para serem classificados com prebióticos devem atender aos seguintes critérios: (i) não serem hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal superior, (ii) serem

seletivamente fermentados por gêneros específicos de microbiota intestinal (iii) serem capazes de alterar a microflora intestinal para uma composição mais ativa e saudável (ROBERFROID; GIBSON; HOYLES et al., 2010).

Os FOS são classificados como prebióticos por conta da sua natureza bifidogênica, que inibem a atividade de bactérias intoxicantes ao organismo. Estes oligossacarídeos são capazes de promover seletivamente o crescimento de probióticos e levar à manutenção de bactérias benéficas no trato digestivo, equilibrando a microbiota intestinal e promovendo, assim inúmeros benefícios à saúde. Apresenta propriedades não cariogênicas, anticancerígenas, baixo teor calórico, podendo ser ingeridos até mesmo por diabéticos quando consumidos em quantidades recomendadas (KIM et al., 2000; MUTANDA et al., 2014).

Os FOS são indigeríveis e não absorvíveis no trato intestinal superior, sendo 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 benéficos a saúde (HIDAKA et al., 1986). Uma vez que não são digeríveis, também apresentam baixo valor calórico (2,0 kcal/g) e um baixo índice glicêmico (SANTOS-MAIORANO et al., 2015), sendo assim um alimento que pode ser ingerido por diabéticos pois não apresentam efeito no teor de glicose sanguínea do tipo 2 (MABEL et al., 2008; SAULNIER et al., 2007).

A ingestão diária recomendada de FOS é de 5 a 10 g, pois assim o efeito bifidogênico é garantido e também o 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 (MUTANDA et al., 2014).

O consumo de FOS também provoca o decréscimo de teores de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos séricos além da diminuição da pressão sanguínea diastólica (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001), sendo também associado à redução do risco de câncer de colón do intestino, e diminuição de doenças cardiovasculares e da obesidade (POOL-ZOBEL; SAUER, 2007).

3.2 PRODUÇÃO DE FOS

A produção de FOS pode ser realizada por dois diferentes processos. Um deles é o processo fermentativo composto por duas etapas: produção de enzimas por fermentação e, posteriormente, a utilização dessas de forma livre ou imobilizada na etapa reacional. O segundo processo utiliza células completas de um determinado micro-organismo, produzindo o FOS concomitantemente ao processo fermentativo (WANG, 2015).

Industrialmente, a produção de FOS é vantajosa a partir da utilização da enzima purificada, pois as condições ótimas de crescimento dos micro-organismos raramente são coincidentes com a de máxima atividade da enzima. Dentre estas condições estão: pH, temperatura, concentração de substrato, estabilidade à temperatura e pH e parâmetros cinéticos (OLIVEIRA, 2007). Deste modo, o uso de enzimas, resulta em maiores rendimentos, menores tempos de processo, maximização da razão entre a atividade de transfrutoseilação e atividade hidrolítica (A_t/A_h) e maior controle do processo (OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2009; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

Na produção industrial de FOS é utilizada a FTase oriunda de diferentes micro-organismos. Dentre estes podem ser citados fungos como *Penicillium* sp (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014, LIM et al., 2005; USAMI et al., 1991), *Areobasidium* sp. (DOMINGUEZ, et al., 2012; LATEEF; OLOKE; PRAPULLA, 2007; YUN, 1996) e *Fusarium* sp. (PATEL et al. 1994; PATEL et al. 1997).

Por sua elevada produtividade em FTase e elevada atividade de transfrutoseilação, os fungos *Aspergillus* sp. tem sido amplamente estudados por diversos autores (CUERVO-FERNANDEZ, et al., 2004; L'HOCINE et al., 2000; MUSSATTO; TEIXEIRA, 2010; OTTONI; PICCOLI; MOREIRA, 2012; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; ZENG et al., 2016). Existem cerca de 200 espécies do gênero *Aspergillus*, comumente isolados do solo e de plantas em decomposição. Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007). Esses fungos produzem um grande número de enzimas extracelulares e aderidas ao micélio, muitas das quais possuem aplicações biotecnológicas (GUIMARÃES et al., 2007).

Estudos realizados demonstraram que elevados valores de concentração inicial de sacarose, entre 500 a 850 g.L⁻¹, são recomendados para rendimento médio entre 50 a 60% de FOS. A concentração elevada de substrato causa o aumento da razão entre as atividades de

transfrutossilacção e hidrolítica para ação conjunta de FFases e FTases (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

A temperatura operacional de produção de FOS utilizando FTase microbiana varia entre 50 a 60°C. Essa faixa de temperatura influencia favoravelmente a atividade enzimática (CUERVO-FERNANDEZ, et al., 2007; CUERVO-FERNANDEZ, et al., 2004). De acordo com Cuervo-Fernandez et. al (2004), o pH ótimo está relacionado às fontes enzimáticas. As FTases isoladas de alcachofra de Jerusalém possuem pH ótimo entre 3,5 e 5. Aquelas isoladas a partir de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicus* e *Scopulariopsis brevicaulis* tem faixa ótima de pH entre 8 e 9. Porém, a maioria das FTases possuem pH ótimo entre 5 e 6,5. A Tabela 1 mostra temperatura e pH ótimos de produção de FTase de diferentes micro-organismos.

Tabela 1 – Propriedades da FTase produzida por diferentes micro-organismos

Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Aureobasidium pullulans</i> (C-23)	5,0	55	Lee et al. (1992)
<i>A.pullulans</i> (CFR77)	5,0	55	Lateef et al. (2007)
<i>Aspergillus sp.</i>	4,5	52	Arthee (2014)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	5,0-7,0	60	Amrendra et al. (2014)
<i>Aspergillus niger</i> AS0023	5,8	50	L'Hocine et al. (2000)
<i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202	6,0	60	Sangeetha et al. (2005)
<i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301	5,5	30	Cunha (2017)
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	5,0	50	Park et al. (2001)
Marine <i>Aspergillus niger</i>	8,0	65	Ghazi (2007)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	5,5	55	Dhake (2007); Patil (2014)

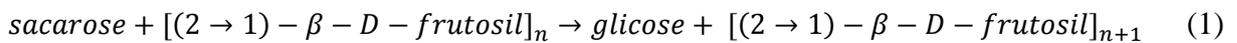
Fonte: Da autora.

3.2.1 Atividade de transfrutossilacção (A_t) e atividade hidrolítica (A_h)

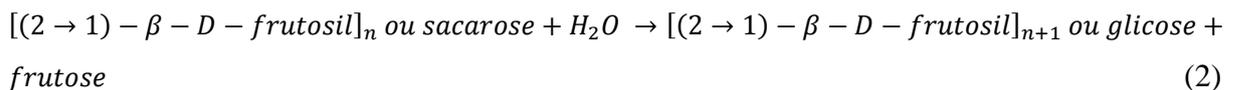
As definições de atividade de transfrutossilacção (A_t) são também divergentes. Os autores Ottoni et al. (2012) e Cuervo-Fernández et al. (2004) definem que esta é a quantidade de enzima que produz um micromol de FOS por minuto. Assim, a concentração de FOS

utilizada por estes autores inclui teores de 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose. Outra definição vem dos autores Ganaie, Lateef e Gupta (2014) que definem que se trata da quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto. Há ainda outros estudos que definem que é a quantidade de enzima necessária para transferir um micromol de frutose por minuto (CHEN; LIU, 1996; HAYASHI et al., 1990; KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996; VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2011).

De acordo com dados da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2018), a FTase (EC 2.4.1.9) promove a transferência de grupos frutosil, conforme esquematizado na Equação (1).



A atividade hidrolítica (A_h) é a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um dos produtos da hidrólise por minuto. Muitos autores definem esta atividade como a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de frutose por minuto (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004; OTTONI; PICCOLI; MOREIRA, 2012). Os autores Ganaie, Lateef e Gupta (2014) definem que a atividade hidrolítica é a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de glicose por minuto. A hidrólise da sacarose ou de FOS está representada na Equação (2).



A razão A_t/A_h é um dado importante a ser analisado quando o objetivo é identificar a produção de FOS por diferentes cepas (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004; HIDAKA et al., 1986). Esta razão indica a predominância da atividade de transfrutossilação sobre a atividade hidrolítica, já que a hidrólise compete concomitantemente com a transfrutossilação, sendo esta mais adequada para a síntese eficiente de FOS. Os elevados valores da razão A_t/A_h são associados a alta produtividade enzimática (OLIVEIRA, 2007).

3.3 MERCADO DE FOS: BRASILEIRO E MUNDIAL

A procura por alimentos mais saudáveis, principalmente funcionais, vem aumentando nos últimos anos. Por essa razão, a indústria alimentícia passou a adotar diferentes tipos de edulcorantes alternativos. Dentre eles, destacam-se os FOS que apresentam excelentes características funcionais e gosto similar ao da sacarose (KUMAR et al., 2015).

O mercado mundial de alimentos funcionais é estimado em 33 bilhões de dólares. Nos EUA, o mercado de prebióticos obteve receitas de 198,3 milhões de dólares em 2014, enquanto na Europa, o mercado de prebióticos chegou a 1,9 bilhões de dólares em 2010. Reino Unido, Alemanha e França representam os principais mercados de comercialização de produtos contendo FOS, detendo cerca de 63% de todo o mercado europeu (KUMAR et al., 2015).

Estima-se 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 diário de 13,7 mg/kg peso corporal (FORTES; MUNIZ, 2010).

O mercado mundial de açúcar convencional começa a ter indícios de declínio na demanda pelo produto por questões de saúde, o que é corroborado por ações de grandes empresas multinacionais do setor alimentício. A empresa Coca-Cola tem em andamento 200 reformulações de produtos, visando a diminuição do teor do açúcar; por sua vez a PepsiCo Inc. tem como meta a redução para níveis máximo de 100 calorias de açúcares adicionados a cada 12 onças (340,19 g) em pelo menos dois terços do volume de produtos vendido pela empresa até o ano de 2025. Seguindo a mesma tendência, a Nestlé afirmou que encontrou uma maneira de reduzir o nível de açúcar no chocolate em até 40% no Reino Unido e na Irlanda (de SOUZA; ALMEIDA, 2017).

Porém, apesar do grande crescimento do mercado mundial de FOS e o baixo custo da sacarose, uma vez que FOS pode ser obtida da transfrutossilção deste açúcar, o Brasil importa quase todo FOS que necessita para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, como exemplo, em barras de cereais, iogurtes e suplementos. Para que toda demanda nacional seja atendida torna-se necessário um processo tecnológico adequado e otimizado para a aplicação industrial (SILVA, 2008).

3.4 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DE FOS

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose que possuem grau de polimerização variando entre 2 e 10, ou seja, oligossacarídeos de cadeia curta que consistem em uma molécula de sacarose associada a uma cadeia de unidades de frutose, conectados por ligações glicosídicas. Elas possuem a estrutura genérica GF_n (no qual G se refere a molécula de glicose, F de frutose e n é o número de unidades do grupo frutose) (YUN et al., 1990). O comprimento da cadeia, a presença da ligação do tipo β e as possíveis ramificações tornam tais compostos resistentes à hidrólise por enzimas digestivas no trato intestinal superior (NINESS, 1999). Os principais FOS representados na Figura 1.

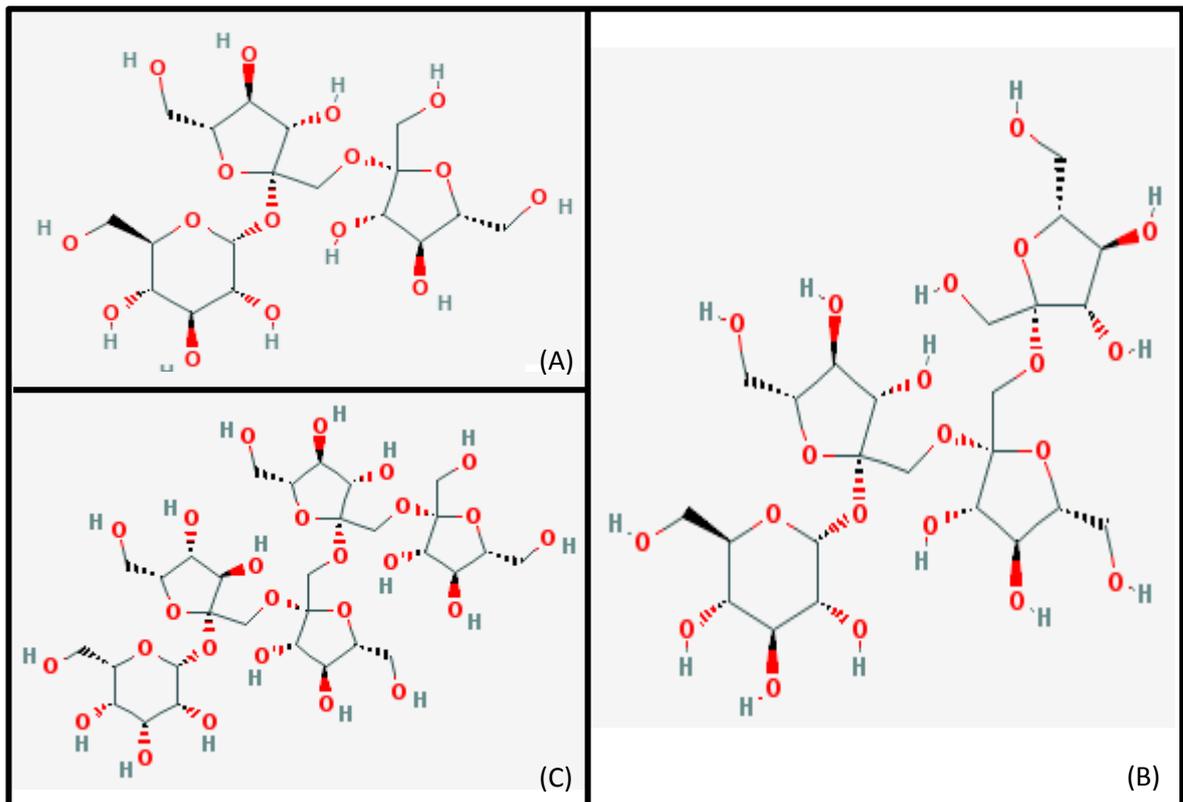


Figura 1 - Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos: (A) 1-kestose (GF₂), (B) nistose (GF₃) e (C) frutofuranosil nistose (GF₄)

Fonte: Da autora.

FOS e oligofrutoses são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos com grau de polimerização inferior a 10. Porém, na literatura, o termo oligofrutose é mais frequentemente utilizado para descrever inulinas de cadeia curta e FOS é utilizado para

descrever misturas de frutanos de cadeia curta sintetizados a partir da sacarose (ROBERFROID, 2007; SAAD, 2006).

Segundo Hebette et al. (1998), FOS podem ser extraídos a partir da inulina. A inulina é o carboidrato de armazenamento energético de raízes e tubérculos possuindo exclusivamente ligações frutossil-frutose do tipo β (2 \rightarrow 1) com uma unidade de D-glucopiranosose (D-Glup) terminal. Os FOS podem ser produzidos a partir da molécula de sacarose por meio da ação de enzimas com atividade de transferência dos grupos frutossil ou por meio da hidrólise enzimática da inulina (MUTANDA, 2014). Nesses dois casos, frutose e glicose são formadas como subprodutos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

FOS ocorrem naturalmente em alimentos como frutas, hortaliças e méis, em níveis normalmente reduzidos (MUNJAL et al., 2009). As principais fontes naturais de FOS são da chicória e alcachofra de Jerusalém. Também são encontrados em cebola, alho, trigo, aspargos, banana e alho-poró (MUTANDA et al., 2014). A quantidade de enzimas produzidas por plantas é reduzida, e limitada por condições sazonais. Deste modo a produção industrial de FOS depende principalmente de enzimas microbianas (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; HERNALSTEENS, 2006).

O primeiro processo sintético de produção industrial de FOS foi realizado no Japão em 1980 pela Meija Seika Kaisha Limited. Posteriormente, outros países, como Estados Unidos, França e Bélgica, começaram a produzir FOS em larga escala. (FORTES; MUNIZ, 2010; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014).

3.5 ENZIMAS PRODUTORAS DE OLIGOSSACARÍDEOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas podem ser definidas como proteínas que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas, sem serem elas próprias alteradas no processo. São altamente específicas para os substratos e conduzem os eventos metabólicos (CAMPESTRINI et al., 2005).

As inulases e FTases são enzimas que catalisam reações de oligossacarídeos, sendo que os principais são os FOS 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose que podem ser sintetizados por enzimas de fontes vegetais e microbianas (TABELA 2). Para aplicação industrial, é tecnicamente difícil extrair essas enzimas das plantas, principalmente devido a

problemas relacionados à disponibilidade, sazonalidade e pequena concentração, sendo preferíveis aquelas de origem microbianas (MUTANDA et al., 2014).

Tabela 2 - Fontes microbianas e vegetais de enzimas produtoras de oligossacarídeos

Fontes vegetais	Referência	Fontes microbianas	Referência
<i>Agave americana</i> (agave)	Bhatia et al. (1979)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Jung et al. (1989)
<i>Agave vera cruze</i> (agave)	Satyanarayana (1976)	<i>Aureobasidium</i> sp.	Hayashi et al. (1990)
<i>Asparagus officinalis</i> (raiz do aspargo)	Shiomi et al. (1982)	<i>Arthrobacter</i> sp.	Fujita (1990)
<i>Allium intybus</i> (cebola)	Henry et al. (1980)	<i>Aspergillus japonicus</i>	Duan et al. (1990)
<i>Cichorium intybus</i> (chicória)	Chandorkar et al. (1974)	<i>Aspergillus niger</i>	Hidaka et al. (1988)
<i>Crinum longifolium</i> (folhas de beterraba)	Bhatia et al. (1979)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kida et al. (1988)
<i>Helianthus tuberosus</i> (alcachofra de Jerusalém)	Praznik et al. (1990)	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Balken et al. (1991)
<i>Lactuca sativa</i> L.(alface)	Chandorkar et al. (1974)	<i>Aspergillus sydowi</i>	Muramatsu et al. (1988)
<i>Lycoris radiate</i> (monocotiledôneas)	Nagamatsu et al. (1990)	<i>Claviceps purpúrea</i>	Dickerson et al. (1972)
<i>Taraxacum officinale</i> (dente-de-leão)	Chandorkar et al. (1974)	<i>Fusarium oxysporium</i>	Patel et al. (1994)
		<i>Penicillium frequentans</i>	Usami et al. (1991)

Fonte: Da autora.

A indústria alimentícia é adepta de processos enzimáticos para a produção de importantes oligossacarídeos, visto que propriedades relacionadas a estereoseletividade e regioseletividade das enzimas são necessárias para a síntese de componentes desta classe química estruturalmente bem definidos (WANG, 2015).

As enzimas produtoras de FOS são as inulases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, a frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9), que transferem grupos frutossil para

moléculas de sacarose e por fim, a β -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) que hidrolisa a sacarose em frutose e glicose (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014).

A FFase apresenta atividade hidrolítica, porém dependendo de sua origem pode apresentar significativa atividade de transfrutossilacção, e em altas concentrações de sacarose obtém-se produções altas de FOS. Já a FTase apresenta alta atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica, pois apresenta uma baixa afinidade pela água, o que propicia a elevada produção de FOS (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001; GHAZI et al., 2007).

A nomenclatura das enzimas envolvidas na produção de FOS é controversa entre os pesquisadores. Segundo L'Hocine et al. (2000) após a separação e purificação da FTase e FFase produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, constataram que a nomenclatura correta é FTase devido à transferência dos grupos frutossil.

Nos trabalhos de Ghazi et al. (2007), discute-se que independente da fonte de origem e da denominação, ambas possuem atividades de transfrutossilacção e hidrolítica limitando a produção de FOS ao uso de altas concentrações de sacarose.

A nomenclatura sistemática da FTase proposta pela IUBMB (2018) é 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.

3.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Há diversos processos de separação e purificação da FTase. Muitos deles aplicam métodos de separação cromatográfica. Entretanto estes processos não são viáveis economicamente devido ao alto custo operacional e a reduzida escala em que são aplicáveis. Ao longo dos anos, vários autores reportaram diferentes técnicas de separação e purificação desta enzima.

A purificação da FTase de extrato cru de *A. niger AS 0023*, foi realizada por L'Hocine et al. (2000) por sucessivas etapas de cromatografia utilizando colunas DEAE (Sephadex A-25, Sepharose 6B, Sephacryl S-200 e concanavalin A-Sepharose 4B). A purificação atingida foi de 97,87%.

Ghazi et al. (2007) descreveu o processo de purificação da FTase do *Aspergillus aculeatus*. A técnica empregada foi cromatografia líquida rápida de proteínas em temperatura

ambiente. As amostras foram filtradas e depois eluídas dentro da coluna de DEAE-Sepharose equilibrada e lavada com tampão fosfato. O rendimento de purificação foi de 36,8%.

Antosová et al. (2008), utilizou a cromatografia de troca iônica para a separação da FTase produzida por *Aureobasidium pullulans*. Para a separação, foi usada uma coluna semi-preparativa de vidro revestida com resina de troca iônica com tamanho de partícula entre 250-300 µm cuja fase móvel foi constituída por um tampão fosfato. Os resultados mostraram que um fator de purificação de 22,3 foi obtido quando se utilizou a enzima bruta na alimentação e cerca de 70% de atividade enzimática foi recuperada das alimentações.

Alvarado-Huallanco e Maugeri Filho (2011) estudaram a produção de FTase a partir da cepa da *Rhodotorula* sp, isolada de flores coletadas da Mata Atlântica do sul do Brasil e selecionada de acordo com sua capacidade de produzir a enzima. A produção foi realizada por fermentação submersa e a purificação realizada por meio de três etapas: precipitação em etanol, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração. Após a purificação primária utilizando a precipitação em etanol, a solução enzimática recuperada foi submetida à percolação em uma coluna iônica equilibrada com 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,5). As proteínas não adsorvidas foram eluídas com o tampão inicial e as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl (0 a 1 mol.L⁻¹) com uma taxa de fluxo de alimentação de 1 ml.min⁻¹. As frações ativas foram concentradas por ultrafiltração e armazenadas a 20°C como enzima purificada. A forma purificada da enzima foi utilizada para produzir FOS, chegando a um rendimento de 57% após 24 h de síntese.

Dahech et al. (2012) purificaram a FTase extracelular produzida a partir da cepa de *Bacillus licheniformis* por meio de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel. A atividade específica da enzima atingiu 67,5 com um fator de purificação de 177 e rendimento de 40%.

Xu et al. (2014) purificou a enzima bruta do sobrenadante de *Penicillium oxalicum*-GXU20. A separação foi feita em cromatografia líquida rápida de proteínas em temperatura ambiente, na qual as amostras foram separadas por uma coluna de fenil equilibrada com tampão fosfato contendo (NH₄)₂SO₄ em pH 7,0. A precipitação em etanol foi eficiente para separar a enzima e aumentar sua atividade, resultando em um rendimento de 79,21%.

A Tabela 3 mostra de maneira resumida as técnicas encontradas da literatura de purificação de FTase.

Tabela 3 – Métodos de purificação da FTase na literatura

Micro-organismo	Técnica	Purificação	Referência
<i>A. niger AS 0023</i>	Sucessivas etapas de cromatografia	97,87%	L'Hocine et al. (2000)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	cromatografia líquida rápida de proteínas	36,8%	Ghazi et al. (2007)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	cromatografia de troca iônica	70%	Antosová et al. (2008)
<i>Rhodotorula sp</i>	precipitação em etanol, cromatografia de troca iônica e ultrafiltração	57%	Alvarado-Huallanco e Maugeri Filho (2011)
<i>Bacillus licheniformis</i>	precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel.	40%	Dahech et al. (2012)
<i>Penicillium oxalicum</i> - GXU20	cromatografia líquida rápida de proteínas	79,21%	Xu et al., (2014)

Fonte: Da autora.

3.7 COLUNA DE BOLHAS E ESPUMAS: PRINCÍPIO DO PROCESSO E UTILIZAÇÃO NA SEPARAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

O fracionamento de componentes em coluna de bolhas e espuma se mostrou viável para a separação e/ou concentração de uma variedade de materiais biológicos ativos de superfície, pois trata-se de um processo de separação de baixo custo fixo e operacional e com reduzido consumo de energia (LUCENA, 1995). A forte natureza anfifílica de proteínas e enzimas faz com que esta sejam preferencialmente adsorvidos na interface gás-líquido (URAIZEE; NARSIMHAN, 1990).

A adsorção em espuma é uma técnica simples, relativamente barato e tem potencial significativo para reduzir o alto custo da recuperação de proteínas (BHATTACHARJEE et al., 1997; BROWN; NARSIMHAN; WANKAT, 1990; NOBLE et al., 1998; PROKOP; TANNER, 1993). Esse processo oferece as vantagens de usar apenas pequenas quantidades de

aditivos químicos, de não requerer grande quantidade energia e de fornecer um processamento contínuo (WONG; HOSSAIN; DAVIES, 2001).

Durante o fracionamento por esta técnica, a separação é conseguida pelo borbulhamento de gás através de uma solução de proteína diluída. As proteínas são adsorvidas na interface gás-líquido das bolhas e essas ascendem na coluna de líquidos, formando uma camada de espuma rica em proteínas. A espuma pode ser recolhida ou colapsada e um solvente rico em proteína é obtido (BHATTACHARJEE et al., 1997).

Um requisito importante de fracionamento de espuma é que todas as moléculas de interesse devem ter atividade superficial para formar espuma estável. A atividade superficial de uma proteína depende das suas características físico-químicas tais como: pH, força iônica, presença de surfactantes, sais e açúcares (AKSAY, 2007).

Este método é adequado para o processamento de soluções diluídas (URAIZEE; NARSIMHAN, 1990) com alto enriquecimento. Em termos de sustentabilidade, pode ser considerado ecológico por utilizar gases inertes (STOWERS et al., 2009). Uma possível desvantagem desse processo pode ser a desnaturação de proteínas na interface gás-líquido (BROWN et al., 1999). Uma variável importante neste processo é a o fluxo de gás. Elevado enriquecimento pode ser obtido por baixas taxas de fluxo de gás, pois proporcionam tempos de residência mais longos, oferecendo mais tempo para a drenagem e adsorção da enzima (MERZ et al., 2009; CHAI et al., 1998).

Em caldos de fermentação, os micro-organismos produzem quantidades diferentes de proteínas. E essas proteínas podem ser sensíveis para altas temperaturas, produtos químicos e, podem sofrer oxidação. A separação em coluna de bolhas e espuma proporciona um ambiente ameno para a separação de proteínas, uma vez que pode ser executado à temperatura ambiente e não requer o uso de grande quantidade de agentes químicos. Além disso, o uso de gás inerte como o nitrogênio pode evitar a oxidação de moléculas sensíveis a esta reação (BURGHOFF, 2012).

O valor do pH é um parâmetro importante na purificação de moléculas de proteína. Em seu ponto isoelétrico, as proteínas possuem carga neutra e são hidrofóbicas. Desta forma, tornam-se menos solúveis em água e anexam preferencialmente à interface gás-líquido. Contudo, baixa solubilidade em ponto isoelétrico também pode causar precipitação e agregação de proteínas (SHEA et al., 2009).

Outro efeito que pode afetar a separação de proteínas por esta técnica é a presença de proteínas concorrentes. Noble (1998) afirmou que mistura de albumina de soro bovino com caseína não produziu separação, provavelmente devido a atividades superficiais muito

semelhantes de caseína e albumina de soro bovino, afirmando que este é um potencial fator na limitação do processo. Zhang (2011) descreve que durante o fracionamento da espuma de celulase do caldo, estas proteínas não foram purificadas na fase de espuma. No entanto, a adição de substratos de celulase e análogos de substrato melhoraram o enriquecimento da celulase na espuma devido a uma melhor interação de complexo enzima/substrato com a interface gás-líquido.

A partir dos trabalhos reportados na literatura, torna-se interessante fazer um histórico dos estudos pioneiros que utilizaram essa técnica em sistemas diversos com o objetivo de separar, purificar ou enriquecer diferentes compostos.

Andrews e Schultz (1945) foram os primeiros a utilizar esse método para separar renina de pepsina a partir de misturas em soluções. Bader e Schultz (1946) recuperaram e purificaram a enzima colinesterase a partir do soro sanguíneo. Posteriormente, foram efetuados estudos de fracionamento de albumina do soro bovino (BSA) por Schnepf et al. (1959) usando sistema batelada com reciclo em coluna em espiral. Charm et al. (1966) separou amilase da catalase, Holmström (1968) separou estreptoquinase do meio de cultura, e lisozima a partir de soluções contendo DNA.

Ahmad (1975) estudou o fracionamento da BSA. A recuperação de BSA foi de 90% e constatou-se que o processo foi eficiente de recuperação em baixas concentrações de proteínas a partir de culturas líquidas, sendo aplicado a uma ampla variedade de sistemas proteicos, sendo mais eficaz em espumas estáveis (LALCHEV et al., 1982).

Foi também estudada a separação e concentração de celulasas utilizando coluna de bolhas e espuma, obtendo soluções no topo da coluna de fracionamento com concentrações entre duas a cinco vezes maior do que no líquido inicial (ROSA, 1996). Lucena (1995) reporta o fracionamento de proteínas em coluna de bolhas e espuma visando a separação da albumina atingindo um produto de topo de 7 a 9 vezes mais concentrado que a solução inicial. Perna (2010) também reportou a aplicação da coluna de bolhas e espumas para concentrar, separar e recuperar substâncias biológicas a partir de soluções diluídas, como por exemplo, o biosurfactante surfactina, obtendo um valor de enriquecimento de, aproximadamente 52,5 vezes utilizando uma solução com baixa concentração de surfactina ($240,0 \text{ mg.L}^{-1}$), baixa vazão de gás (20 mL.min^{-1}) e temperatura de operação relativamente alta (35°C).

Outro estudo feito utilizou a coluna de bolhas com o objetivo de extrair proteínas do soro do iogurte e do soro do queijo a partir dos resíduos de uma indústria de laticínios. Os resultados indicaram que utilizando esse método a capacidade de extrair proteínas é alta, sendo maior no soro de iogurte do que no soro de queijo (MATOUQ, 2008).

Liu et al. (2013) utilizaram uma coluna com um componente interno em espiral a fim de recuperar proteína de batatas a partir de águas residuais de processamento dessas. Uma tecnologia de separação de dois estágios foi projetada para melhorar a proporção de enriquecimento e a porcentagem de recuperação da proteína da batata. Os resultados mostraram que uma melhor relação de enriquecimento da proteína da batata de 4,69 foi obtida nas condições operacionais de 45°C de temperatura, pH 7,0, vazão de ar de 100 ml. min⁻¹. A porcentagem de recuperação total da proteína da batata foi de 73,4%.

A separação em coluna de bolhas e espuma também foi utilizada a fim de concentrar saponinas de juá e sisal, que são moléculas com propriedades surfactantes utilizadas para a produção de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. As saponinas do juá foram recuperadas em 82,6% com um fator de enriquecimento 3,46 vezes a inicial, já as saponinas do sisal, obtiveram um fator de enriquecimento de 1,98 com cerca de 90,5% de recuperação (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2013). A Tabela 4 traz de maneira resumida alguns processos de separação/purificação utilizando a coluna de bolhas e espuma encontrados na literatura.

Tabela 4 – Processos de separação/purificação utilizando coluna de bolhas e espuma na literatura

Autores	Separação/purificação
Andrews e Schultz (1945)	Separar renina da pepsina
Bader e Schultz (1946)	Recuperar e purificar colinesterase
Schnepf et al. (1959) Ahmad (1975)	Concentrar albumina do soro bovino (BSA)
Charm et al. (1966)	Separação da amilase da catalase
Rosa (1996)	Separar e concentrar celulase
Lucena (1995)	Separar albumina
Perna (2010)	Concentrar, separar e recuperar surfactina
Matouq (2008)	Extrair proteínas do soro de iogurte e queijo
Ribeiro; Barreto; Coelho (2013)	Concentrar saponinas de juá e sisal

Fonte: Da autora.

3.7.1 Leito de espuma

Durante o fracionamento em espuma, as bolhas de gás são introduzidas em um líquido que contém substâncias ativas. A formação de espumas ocorre quando moléculas ativas de superfície se ligam à interface gás-líquido das bolhas introduzidas. A formação de espuma pode ser causada por substâncias dissolvidas ou substâncias dispersas. A tensão superficial da interface é diminuída e a espuma é estabilizada. A atividade de superfície é medida em termos dessa tensão superficial, na qual a menor tensão superficial indica maior atividade de superfície. Assim, as bolhas formadas criam uma coluna de espuma emergente acima do nível do líquido (BURGHOFF, 2012).

O arranjo das bolhas segue as leis de Plateau, apresentando a tendência de minimizar a área superficial. Três filmes adjacentes de espuma encontram-se ao longo de uma linha curva com ângulos de 120° entre eles. Quando há o rompimento de um desses filmes, as bolhas rearranjam-se de modo a manter essa conformação. A expansão do gás ocorre por meio da ruptura desses filmes e difusão entre as bolhas. Essa difusão ocorre das células menores, nas quais é maior a pressão do gás aprisionado, para as células adjacentes maiores, tendo como resultado mudanças na distribuição inicial de suas dimensões. (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADIN, 1999).

A geometria observada em bolhas de espumas pode ser esférica ou poliédrica. As bolhas esféricas são formadas por filmes líquidos espessos e frequentemente são observados no início de formação de uma espuma. À medida que o líquido é drenado, os filmes vão se afinando e diminuindo a distância entre as bolhas de gás, as quais adquirem formato poliédrico. As bolhas poliédricas presentes em espumas em quase toda extensão da coluna, costumam serem formadas a partir de líquidos de baixa viscosidade (FIGUEREDO; RIBEIRO; SABADIN, 1999).

Ao fim da coluna de espumas, há o recolhimento da espuma, onde ela é colapsada e se torna uma solução enriquecida de componentes de superfícies ativas (BURGHOFF, 2012).

3.8 SURFACTANTES EM MOLÉCULAS NA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS E EFEITO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A adição de surfactantes no processo de separação de proteínas em coluna de bolhas e espuma é utilizada com o intuito de melhorar a estabilidade da espuma, podendo levar a alteração da atividade da proteína. Geralmente, a adição de surfactantes aumenta a recuperação enquanto diminui o enriquecimento devido à adsorção competitiva entre surfactante e proteínas, formação de bolhas menores e menor drenagem (SHEA et al., 2009).

Diversos estudos demonstram o efeito estimulante de surfactantes na concentração de enzimas microbianas no meio extracelular. Os agentes tensoativos mais utilizados são Tween 80, Tween 20, Triton X-100 e polietilenoglicol (PEG). Esses compostos tem a propriedade de aumentar a permeabilidade da membrana da célula, aumentando a secreção das enzimas para o meio extracelular (MACIEL, 2013).

O Tween 80® (FIGURA 2) é um dos polioxietileno da família dos surfactantes não-iônicos que incluem, entre outros, os Tritons (X-100 e X-114) e os Genapols (X-080, X-100 e X-150). Estes surfactantes são suaves em sua ação, e a maioria das enzimas mantém sua atividade após a exposição a níveis de 1-3% (m/v) (STUTZENBERGER, 1992).

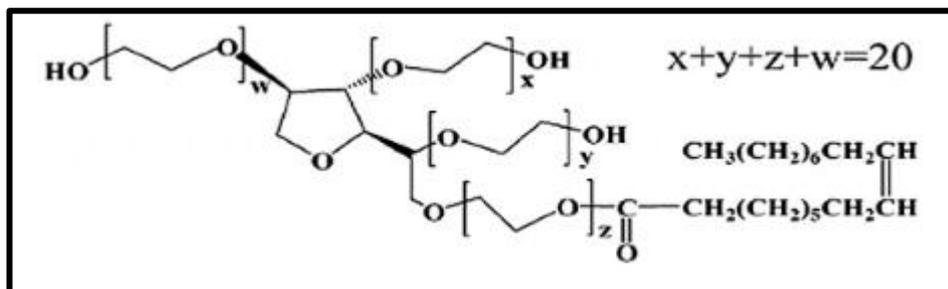


Figura 2 - Estrutura química do Tween 80
Fonte: RABIEE et al. (2016, p. 4052)

Bezegues et al. (2008) mostrou que Tween 80® difunde comparativamente rápido para a interface gás-líquido, enquanto o isolado de proteína de soro de leite necessita mais de 20 segundos para difundir na interface gás-líquido. Isso se deve à diferente mobilidade molecular baseada no peso molecular do surfactante e proteína. No entanto, se um aumento de recuperação for desejado, a adição de surfactante é uma medida adequada (BURGHOFF, 2012).

O fracionamento por espuma de lipases alcalinas extracelulares produzidas por *Fusarium* sp., em fermentação submersa suplementada com Tween 80®, obteve a máxima taxa de recuperação da atividade lipolítica a $60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em pH 8,5. Nestas condições, mais de 90% da atividade total da lipase foi recuperada na espuma com enriquecimento e fatores de purificação de 8,8 e 5,9, respectivamente (dos PRAZERES et al., 2007).

O processo de fracionamento de espuma para remover a lacase do sobrenadante de uma cultura submersa de *Pleurotus sapidus* foi dependente da concentração de CTAB (brometo de cetil trimetil de amônia). Esse surfactante mostrou-se melhor para formar e estabilizar a espuma. Foi atingida uma recuperação de 70,4% da atividade total da lacase (LINKE et al., 2007).

Mukhopadhyay et al. (2010) usaram dodecil sulfato de sódio com uma relação de proteína para surfactante de 1,5:1 e parâmetros de processo otimizados para remover proteínas de resíduos de soro. O maior enriquecimento alcançado foi de 48 e a maior recuperação de 96%.

A adição de Tween 80® à cultura de *Coprinopsis cinerea* diminuiu significativamente a recuperação da atividade enzimática da enzima cutinase de 80% para 6% e enriquecimento de 4,3 para 1,1, embora os tempos de formação de espuma tenham aumentado de 15 min para mais de 60 min. Isso pode ser explicado por uma substituição das moléculas de proteína na interface gás-liquido por moléculas surfactantes (MERZ et al., 2009).

A celulase é um composto que por si só apresenta pouca produção de espuma, então a adição de um surfactante pode aumentar o volume de espuma e aumentar a concentração da celulase na mesma. Burapatana (2005) adicionou três tipos de surfactantes a fim de melhorar a espumabilidade. Esses surfactantes foram tensoativos aniônicos, catiônicos e não iônicos. Observou-se que a adição de surfactante não iônico (Pluronic F-68) apesar de contribuir para a produção de espuma, não resultou em boa concentração da celulase. O surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio e o tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) resultaram em uma proporção de enriquecimento bem maior, porém houve a desnaturação da celulase, reduzindo a atividade da enzima. Com o objetivo de restaurar a atividade enzimática, β -ciclodextrina (agente de remoção de surfactante) foi adicionado após a concentração da celulase na sequência ao CTAB.

Maciel (2013) avaliou o efeito do Tween 80® sobre a produção de celulases a partir de *M. circinelloides* e *Melanoporia* sp. Como resultado, observou-se que a produção máxima da enzima obtida a partir de *M. circinelloides* foi alcançada com a adição de 0,8% (v/v) e para *Melanoporia* sp., a adição de Tween 80® foi de 0,2% (v/v) ao meio de cultura. Essas

condições proporcionaram um aumento de 163,16% e 57,74%, respectivamente, na atividade enzimática em relação ao experimento realizado sem a adição do surfactante. A Tabela 5 traz de modo resumido a utilização de surfactantes na recuperação de atividades enzimáticas na literatura.

Tabela 5 – Utilização de surfactante na recuperação de atividades enzimáticas na literatura

Autores	Surfactante	Finalidade	Recuperação na atividade
Dos Prazeres et al. (2007)	Tween 80	Recuperação de lipase	90%
Linke et al. (2007)	CTAB	Recuperar lacase	70,4%
Mukhopadhyay (2010)	Dodecil sulfato de sódio	Remover resíduos do soro	96%
Maciel (2013)	Tween 80	Aumento na atividade enzimática de <i>M. circinelloides</i> e <i>Melanoporia</i> sp	163,16% e 57,74%
Merz et al. (2009)	Tween 80	Aumento de atividade de <i>Coprinopsis cinerea</i>	De 80% para 6%

Fonte: Da autora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse tópico são apresentadas as condições de cultivo *do Aspergillus oryzae* IPT-301, a descrição e operação da coluna de bolhas e espuma e os métodos analíticos empregados no trabalho.

4.1 *Aspergillus oryzae* IPT-301 E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A fim de produzir a enzima FTase, utilizou-se a cepa do fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301, que foi 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 suspenso em 10 mL de água destilada e alíquotas de 1000 µL foram inoculadas em meio sólido contendo (% m/v): ágar batata dextrose (KASVI®) 2,0; glicerina (Isofar®) 2,5; extrato de levedura (Synth®) 0,5 e glicose (Dinâmica®) 2,5. O período de incubação foi de 7 dias a 30°C em incubadora refrigerada do tipo B.O.D (Tecnal®, modelo TE-371).

Nos esporos produzidos foram adicionados uma solução constituída por NaCl (Dinâmica®) 0,95% (m/v) e Tween-80 (Dinâmica®) 0,1% (v/v) e houve a raspagem do mesmo utilizando alça de Drigalski. A suspensão obtida foi homogeneizada com solução de glicerina (Isofar®) 20,0% (m/v), cujo volume foi variável, a fim de ajustar a concentração de esporos para aproximadamente 1×10^7 esporos.mL⁻¹, os quais foram quantificados com auxílio de uma câmara de Neubauer (Newoptics®), seguido de armazenamento sob refrigeração a -12°C.

4.1.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a fermentação e crescimento microbiano foi baseado no descrito por Cuervo-Fernández (2004) e foi constituído por (% 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; MnCl₂4H₂O (Synth®) 0,03; e FeSO₄. 7H₂O (Synth®) 0,0001. O pH foi ajustado para 5,5 com uso de solução de NaOH (Synth®) 0,01 mol.L⁻¹.

Foram colocados cerca de 100 mL deste meio de cultura em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL e autoclavados a 120°C e 1,022 atm durante 15 min.

Após a autoclavagem, foram inoculados 1000 µL de suspensão contendo cerca de 1x10⁷ esporos.mL⁻¹ no meio de cultura. A fermentação foi realizada em agitador orbital shaker (Tecnal®, modelo TE-4200) a 30°C e 200 rpm durante 64 h de processo. Após esse tempo de fermentação, o conteúdo do frasco Erlenmeyer foi filtrado, e em seguida a atividade de transfrutossilatação e hidrolítica das enzimas presentes foram quantificadas.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Neste tópico, são apresentados os métodos para determinação da atividade enzimática, determinação de açúcares redutores totais e glicose. Também são apresentadas as metodologias para a determinação da capacidade de formação de espuma, teste do efeito do surfactante na atividade enzimática e por fim, o método de quantificação total de proteínas.

4.2.1 Determinação da atividade enzimática

Uma unidade de atividade enzimática de transfrutossilatação foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de FOS por minuto, expresso como soma da concentração de 1-kestose, nistose e β-frutofuranosilnistose. Enquanto que a atividade hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera um 1 µmol de frutose por minuto sob as condições reacionais do meio (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004; GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014; OTTONI; PICCOLI; MOREIRA, 2012).

Dessa forma, a concentração de frutose transferida é obtida indiretamente pelo balanço de massa dado na Equação (3):

$$[FOS]=[G]-[F]=2[G]-[ART] \quad (3)$$

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

$$[ART]=[F]+[G] \quad (4)$$

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

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

As atividades enzimáticas extracelulares foram quantificadas aplicando-se o protocolo experimental descrito a seguir.

Em um tubo falcon de 15 mL foram adicionados 1,2 mL de tampão tris-acetato (Synth®) 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,5 e 3,7 mL de solução de sacarose P.A. 63,6% (m/v) (Synth®). Tal mistura foi previamente aquecida durante 10 min a 50°C.

A reação enzimática foi realizada adicionando-se 100 μL do caldo de fermentação. Essa reação foi conduzida em banho Dubnoff por 60 min a 50°C e 190 rpm. A reação foi interrompida pela fervura durante 10 minutos, seguida por banho de gelo para a desnaturação da enzima (CUERVO-FERNÁNDEZ et al., 2004; OTTONI; PICCOLI; MOREIRA, 2012).

A partir desta mistura reacional, foi determinada a concentração de açúcares redutores totais por meio do método DNS (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013) e a concentração de glicose por meio do método descrito pelo protocolo do kit enzimático GOD-PAP. A partir dos valores obtidos, as concentrações de frutose e de FOS foram quantificadas pelas Equações (5) e (3) respectivamente.

A atividade de transfrutossilação extracelular (A_t^{extra}) foi calculado pela Equação (6):

$$A_t^{extra} = \frac{[FOS] V_R}{t_R V_{enzimático}} \quad (6)$$

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

A atividade hidrolítica extracelular (A_h^{extra}) foi determinada pela Equação (7):

$$A_h^{extra} = \frac{[F] V_R}{t_R V_{enzimático}} \quad (7)$$

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

4.2.1.1 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) por DNS

A concentração de açúcares redutores totais (ART) presente no meio reacional foi determinada pelo método DNS seguindo o protocolo desenvolvido pela Embrapa para o uso em laboratório de bioprocessos (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013).

Primeiramente, foi preparada uma solução de DNS, como descrito a seguir. Completando um volume final de 1,0 L, 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Dinâmica®) ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) foram adicionados a 200 mL de uma solução 2 M de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®), recém-preparada (solução A). Em paralelo, 300 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Dinâmica®) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada (solução B), sob aquecimento e agitação constantes. Ainda nessas condições, adicionou-se a solução A na solução B até a completa dissolução do DNS. Após resfriamento, a mistura foi transferida para balão volumétrico de 1.000 mL o volume completado com água destilada. O reagente é armazenado em frasco de polipropileno ao abrigo da luz.

A marcha analítica é composta pelas seguintes etapas:

Primeiramente 1,0 mL da mistura reacional resultante da etapa de atividade enzimática foi adicionada em 1,0 mL da solução de DNS (ácido dinitrossalicílico); agitada e aquecida a 100°C por 10 min. A solução foi resfriada em banho de gelo por 5 min e adicionados 8,0 mL de água destilada. Para obtenção do branco, as mesmas etapas foram realizadas, substituindo a alíquota da mistura reacional por água destilada. As absorbâncias são quantificadas por meio de espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) em comprimento de onda em 540 nm.

A curva de calibração do método DNS foi construída com base em solução padrão de glicose 1,0 g/L (Dinâmica®) e se realizou as diluições necessárias para obter concentrações até 1,0 g/L (APÊNDICE A). A curva analítica foi obtida por meio de regressão linear, obtendo a equação da reta da curva de calibração (Equação 8).

$$[\text{AR}] = a \cdot (\text{abs}) + b \quad (8)$$

em que [AR] é a concentração de açúcares redutores totais, a é o coeficiente angular da reta, (abs) é a absorvância medida no espectrofotômetro, b é o coeficiente linear.

A concentração de glicose no meio reacional enzimático foi obtida pela multiplicação da concentração determinada pela equação da reta e diluição realizada.

4.2.1.2 Determinação da concentração de glicose pelo protocolo GOD-PAP

A concentração de glicose foi determinada utilizando o protocolo do kit enzimático GOD-PAP. Este é composto pelas enzimas glicose oxidase (GOD), peroxidase (POD), 4-aminoantipirina (4-AAT), tampão fosfato com concentração $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e pH 7,5 e fenol.

Foram adicionados em um tubo de ensaio $40 \mu\text{L}$ da mistura reacional e 4 mL de solução reagente GOD-PAP. A reação é realizada em banho Dubnoff (Bunker®, modelo NI 1232) a 37°C por 5 min , sendo a coloração final estável por 30 min . As absorvâncias foram quantificadas em espectrofotômetro (Edutec®, modelo EEQ901A-B) em comprimento de onda em 505 nm .

A curva de calibração do método GOD-PAP foi construída com base em solução padrão de glicose (Dinâmica®) $1,0\text{g/L}$, sendo realizadas as diluições necessárias para obter concentrações até $1,0 \text{ g/L}$ (APÊNDICE A). Com a marcha analítica realizada, e por meio de regressão linear, obteve-se a equação da reta da curva de calibração (Equação 9).

$$[G] = c \cdot (abs) + d \tag{9}$$

em que: [G] é a concentração de glicose, c é o coeficiente angular da reta, (abs) é a absorvância medida no espectrofotômetro, d é o coeficiente linear.

A concentração de glicose no meio reacional enzimático foi obtida pela multiplicação da concentração determinada pela equação da reta e diluição realizada na amostra.

4.2.2 Determinação da capacidade de formação de espuma

O teste de capacidade de formação de espuma (CFE) foi realizado a fim de verificar a melhor condição de espumabilidade sob diferentes condições de diluição, pH e concentração de agente espumante.

Primeiramente, a altura do caldo em um tubo é medida. Posteriormente, esse tubo é agitado manualmente por 1 min e logo em seguida, a altura final (caldo + espuma) é medida novamente. A CFE é avaliada por meio da Equação 10:

$$CFE (\%) = \frac{Altura_{após\ agitação\ (cm)} - Altura_{antes\ agitação\ (cm)}}{Altura_{antes\ agitação\ (cm)}} \times 100 \quad (10)$$

Dessa forma, caso a altura final medida (caldo + espuma) for o dobro da altura inicial, o CFE encontrado será 100%.

Neste teste, avaliou-se o CFE dos sistemas constituídos por caldo fermentado sem diluição, caldo fermentado diluído em água destilada 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v) e com a adição de diferentes concentrações de surfactante Tween-80 (Dinâmica®): 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2% (m/v) em pH 4,5 e 5,5. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2.3 Teste do efeito de Tween 80® na atividade enzimática

A avaliação do efeito da adição de Tween 80® na atividade hidrolítica e de transfrutossilação da FTase foi realizada em diferentes concentrações do surfactante.

Primeiramente foi adicionado 0,5% (m/v) do surfactante no início do processo fermentativo, de modo a observar se haveria algum ganho em relação a produção, ou excreção para o meio extracelular da FTase.

Após verificada queda na atividade do caldo devido a adição do surfactante no início da fermentação, este foi adicionado após o processo fermentativo, de modo a se verificar o seu efeito na excreção e/ou atividade da FTase no meio, nas concentrações 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5%, 2% e 3% (m/v).

4.2.4 Quantificação de proteína total por meio do método Dumas

As análises das concentrações de proteínas totais no caldo inicial, caldo final e espuma total foram feitas por meio do método Dumas. Este consiste na utilização de temperaturas elevadas, resultando na oxidação total da amostra, reduzindo os óxidos de nitrogênio. Dessa forma, a concentração de proteínas é obtida a partir da detecção do nitrogênio molecular produzido (VIEIRA et al., 2017). O equipamento utilizado para essa análise foi o Leco (modelo FP-528), cujo limite de detecção é 0,003 mg de nitrogênio (CQA QUÍMICA, 2018)

4.3 SEPARAÇÃO NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA

Nesse tópico, são apresentados a descrição e funcionamento da coluna de bolhas e espumas utilizada nesse trabalho.

4.3.1 Descrição da coluna de bolhas e espuma

O aparato utilizado foi composto por duas colunas de vidro sobrepostas, a coluna inferior, denominada de coluna de líquido ou de bolhas com comprimento aproximado de 35,5 cm e diâmetro interno de 30 cm e a superior, e a coluna de espuma, com comprimento de 125,5 cm e diâmetro interno de 12 cm. Esse aparato experimental foi projetado com base ao aparato utilizado por Perna (2010). O esquema do sistema é mostrado na Figura 3 e a Figura 4 apresenta uma fotografia do mesmo.

Ao longo de todo o comprimento da coluna há uma camisa térmica, onde há a circulação de água para controle de temperatura de 25°C por um banho termostático. O gás nitrogênio pressurizado é inserido na coluna sob vazão de 1 L.min⁻¹ controlada manualmente por uma válvula agulha inserida na tubulação. Antes de ser inserido na coluna, o gás é previamente borbulhado em água destilada contida em um umidificador. Na parte superior da coluna, a espuma é recolhida em um recipiente de vidro.

A técnica de funcionamento da coluna baseou-se na injeção de gás nitrogênio na base da coluna através de placas de vidro sinterizado, proporcionando o borbulhamento uniforme do gás no interior da solução. À medida que as bolhas de gás ascenderam através da solução, moléculas concentradas na interface gás-líquido foram transportadas para a fase espuma que se formou quando as bolhas enriquecidas saíram da fase líquida.

Este sistema permite que a espuma se eleve axialmente, ocorrendo, então, a drenagem de uma porção de líquido, resultando na concentração do soluto de interesse. A espuma gerada é removida, obtendo-se uma solução enriquecida no soluto, denominado produto de topo (LUCENA, 1995).

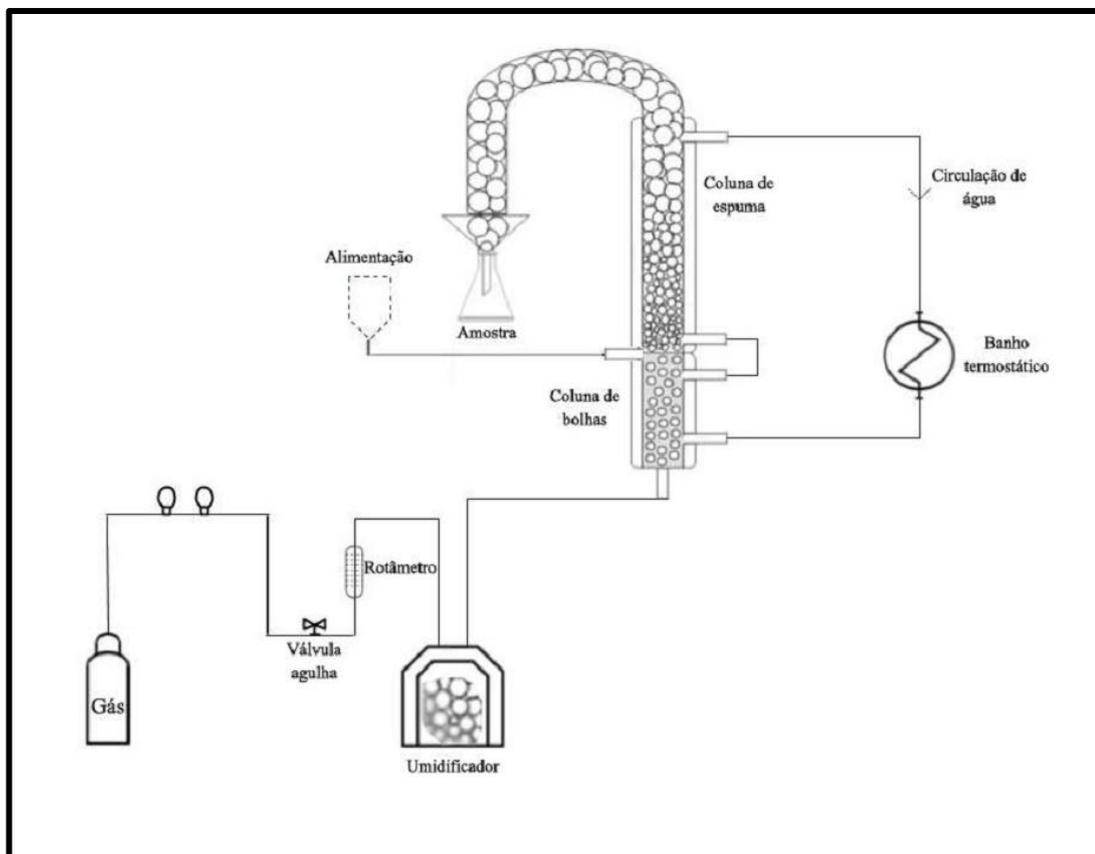


Figura 3 - Esquema do aparato experimental utilizado no fracionamento da FTase em coluna de bolhas e espuma

Fonte: Da autora.



Figura 4 - Coluna de bolhas e espuma
Fonte: Da autora.

4.3.2 Teste das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma

Foram avaliadas as concentrações de Tween 80® de 0,3 e 0,4% (m/v) no caldo sem diluição e em diluições 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 (v/v). Para essas condições foram avaliados parâmetros operacionais como: alteração de pH com o decorrer do processo, tempo de residência, tempo de processo, velocidade média de ascensão da espuma.

De modo a avaliar possíveis alterações do pH do caldo no decorrer do processo, foi realizado o procedimento a seguir: inicialmente o pH do caldo foi ajustado com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para pH 5,5; no decorrer do processo alíquotas da coluna de líquidos foram retiradas de 15 em 15 minutos para medição do pH.

O tempo de residência inicial foi estipulado como o instante em que se começou a formar as primeiras bolhas resultantes do gás nitrogênio borbulhado na base coluna e foi considerado finalizado no momento em que a primeira quantidade de espuma foi retirada no topo da coluna.

O tempo do processo foi estipulado como sendo o período entre a formação das primeiras bolhas até o momento em que a espuma se apresentava instável e descontínua na coluna de bolhas.

A velocidade média de ascensão da espuma foi medida na coluna de espuma. Essa parte da coluna foi dividida em intervalos de 10 cm e o tempo que a espuma gastava para percorrer cada um desses 10 cm foi cronometrado, sendo posteriormente calculada a média entre eles.

4.3.3 Separação enzimática na coluna de bolhas e espumas

O caldo de fermentação foi previamente filtrado para a retirada de compostos insolúveis, dentre eles a biomassa. Após a filtração do caldo, diferentes diluições de caldo com água destilada totalizando 1,0 litro de caldo foram colocados na coluna de líquidos. O nitrogênio com uma vazão aproximada de 1 L.min^{-1} foi inserido no fundo da coluna, o qual se dispersou na placa de vidro sinterizado, formando bolhas. As bolhas ascenderam pela coluna, com temperatura controlada de 25°C pelo banho termostático. Na parte superior da coluna a espuma com material aderido em sua superfície era quebrada e recolhida.

Na coluna de líquidos e na saída da coluna de espumas eram recolhidas alíquotas do material em intervalos de 15,0 minutos, sendo a primeira coleta após começar a sair a primeira fração da espuma no topo da coluna. O pH correspondente foi verificado a cada coleta da coluna de líquidos.

Os tempos de residência de todos os ensaios foram próximos e em torno de 25 minutos. Foram recolhidas em torno de 5 alíquotas a cada 15 minutos da coluna de líquidos e da coluna de bolhas, ao mesmo tempo, totalizando em média 100 minutos de processo. O

processo se encerrou quando a espuma da coluna começava a perder a estabilidade, se mostrando não uniforme e apresentando espaçamento.

As atividades de transfrutossilção, hidrolítica e as razões entre elas, do caldo inicial com o tensoativo, caldo final da coluna de líquidos e da espuma total foram quantificadas. A concentração de proteínas totais foi realizada utilizando o método Dumas, descrito no item 4.2.4.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS

A fim de facilitar a discussão dos resultados, cada ensaio realizado na coluna de bolhas e espuma recebeu uma numeração correspondente à concentração de surfactante utilizado, condição de diluição e pH. Essa codificação está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Identificação dos ensaios realizados na coluna de bolhas e espuma

Ensaio	Concentração de Tween (m/v)	Diluição (v/v)	pH
1	0,5%	1:1	5,5
2	0,5%	Sem diluição	5,5
3	1,0%	1:1	5,5
4	1,0%	Sem diluição	5,5
5	1,5%	Sem diluição	5,5
6	1,5%	1:1	5,5
7	1,5%	1:2	5,5
8	1,5%	1:3	5,5
9	1,5%	Sem diluição	6,5
10	1,5%	Sem diluição	7,5

Fonte: Da autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse tópico, utilizamos alguns termos os quais valem a pena serem definidos detalhadamente. O caldo inicial se refere ao caldo fermentado com o surfactante Tween 80® na concentração determinada; o caldo final é o caldo remanescente na coluna de líquidos após o processo de separação; a espuma total se refere à toda espuma coletada durante o processo no topo da coluna de bolhas. Por fim, a atividade relativa de transfrutossilagem corresponde à atividade de transfrutossilagem medida em cada intervalo de tempo, dividida pela atividade de transfrutossilagem do caldo inicial.

5.1 ESTUDO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA (CFE)

A CFE foi estudada com o intuito de averiguar as melhores condições para a formação de uma espuma contínua e estável na coluna de espuma, condição requerida pelo processo. O tensoativo Tween 80® foi escolhido, uma vez que este surfactante tem a capacidade de difundir rapidamente para a interface gás-líquido (BEZELGUES et al., 2008), podendo resultar em aumento da secreção de enzimas ou outras exoproteínas de bactérias e fungos para o meio fermentativo de forma que não seja agressivo a enzimas (STUTZENBERGER, 1992).

A diluição do caldo é utilizada nesse trabalho, pois vários estudos afirmam que a operação de fracionamento de espumas utilizada para concentrar e separar proteínas apresenta melhores resultados em soluções diluídas (SANTANA, 1994).

Os resultados da CFE em função da concentração de Tween 80® em pH 4,5 são mostrados na Figura 5. A adição de 1% (m/v) de tensoativo indicou o maior valor de CFE, em relação à adição de 0,5% e 2% (m/v) de Tween 80®, em ambos os caldos (diluído e não diluído), em pH 4,5. Considerando-se o caldo sem diluição, o aumento foi pouco superior a 100%, enquanto para o caldo diluído, este aumento foi pouco inferior a este valor. Estes resultados indicam que a concentração de surfactante adicionado, o volume de espuma aumentou aproximadamente o dobro do volume de líquido inicial. A concentração de 2% (m/v) de tensoativo indicou uma menor CFE do que a concentração de 1% (m/v).

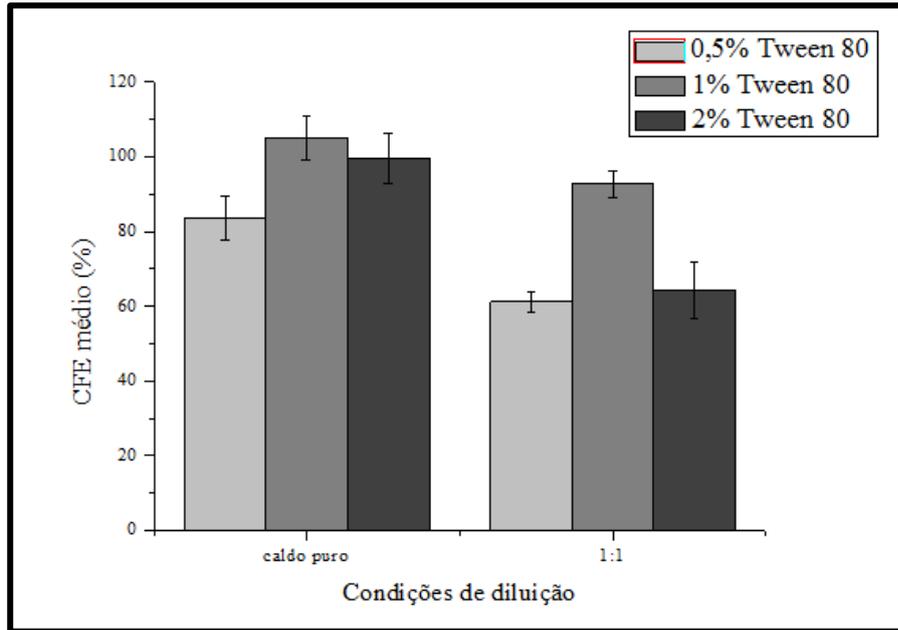


Figura 5 – Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 4,5

Fonte: Da autora.

Na Figura 6 é apresentada a CFE para o caldo em pH 5,5.

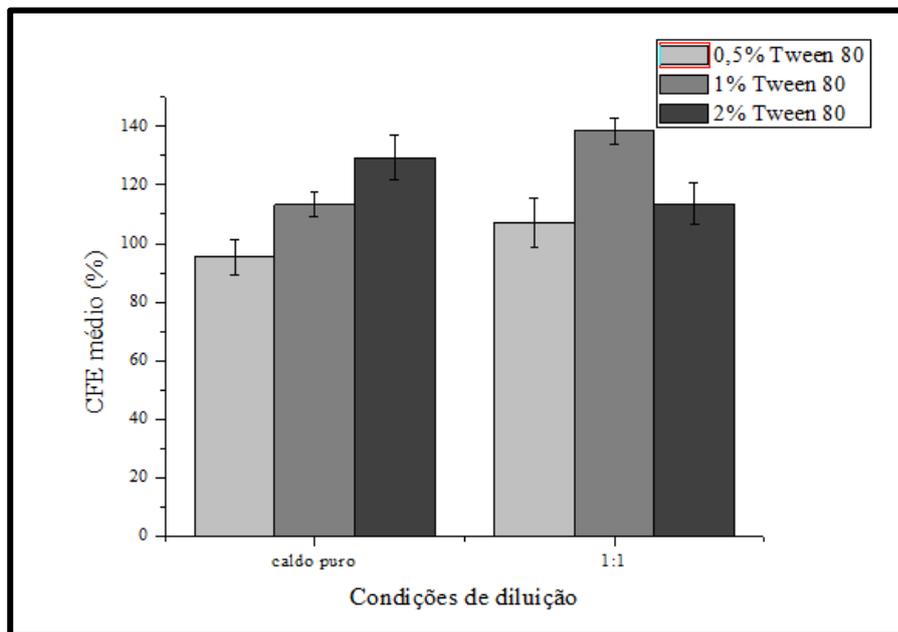


Figura 6 – Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 5,5

Fonte: Da autora.

Na Figura 6, para um pH 5,5, observou-se que a adição de 2% (m/v) de Tween 80® levou a máxima CFE para o caldo não diluído, cerca de 130%, enquanto para o caldo diluído 1:1 (v/v), a máxima formação de espuma foi observada para a adição de 1% (m/v) de Tween® 80, cerca de 140%.

A partir da comparação dos resultados em pH 4,5 e pH 5,5, observa-se que o pH 5,5 apresentou melhores resultados de CFE, tanto para o caldo fermentado sem diluição, quanto na diluição 1:1 (v/v). A adição de 1% (m/v) Tween 80® no caldo sem diluição foi melhor condição em pH 4,5, enquanto que em pH 5,5 a melhor condição se deu para a adição de 1% do surfactante no caldo diluído 1:1 (v/v).

Uma vez que, dependendo do comportamento do surfactante na coluna de bolhas e espuma, o melhor carregamento de enzima pode se dar a menores concentrações de surfactantes e a diluições mais elevadas, também foram testadas, em pH 5,5, diluições e concentrações de surfactante adicionais em relação ao CFE, conforme demonstrado na Figura 7.

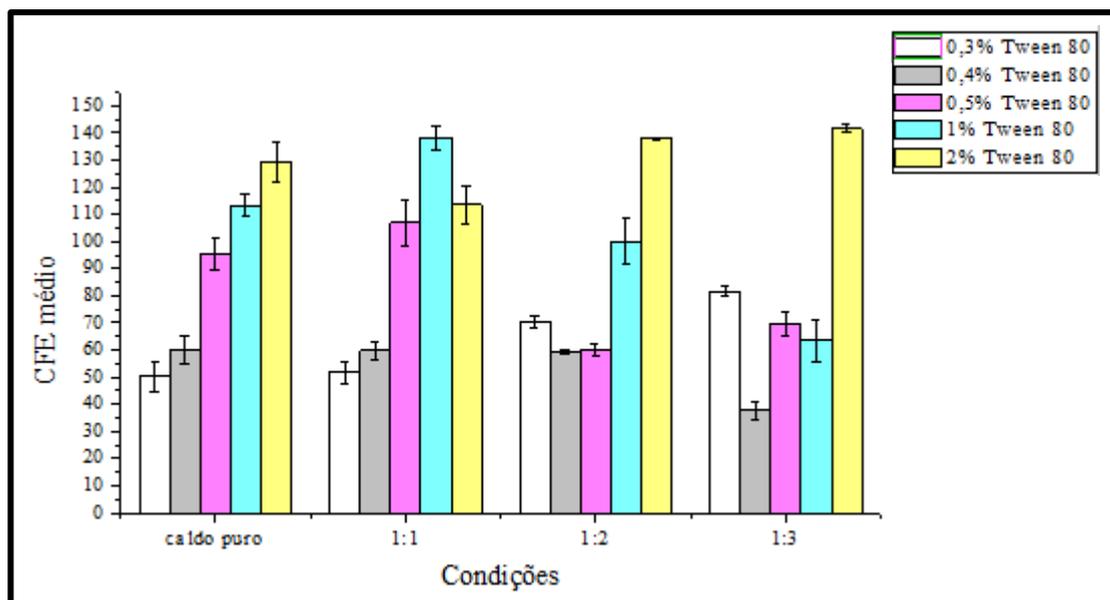


Figura 7 – Capacidade de formação de espuma no caldo fermentado puro e diluído 1:1; 1:2 e 1:3 (v/v) com adição de Tween 80® em pH 5,5

Fonte: Da autora.

Nessas condições demonstradas pela Figura 7, constatou-se que em concentrações de 2% (m/v) de surfactante, de maneira geral a CFE para caldo puro, e em três diferentes diluições, foram similares, resultando em valores aproximadamente entre 130% e 140%. Nas concentrações mais baixa de Tween 80®, a maior CFE, foi de cerca de 85%, para a diluição 1:3 (v/v), enquanto para o caldo puro, e na diluição 1:1 (v/v), as CFEs foram menores, cerca

de 50%. De um modo geral, valores de 0,5% do surfactante resultaram em CFEs acima de 95% para o caldo sem diluição e para a diluição de 1:1 (v/v).

5.2 ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TWEEN 80® NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FTASE

Como forma de se avaliar os efeitos do surfactante Tween 80® nas atividades de transfrutossilação, hidrolítica e a razão entre elas para a FTase, foi realizada a adição de diferentes concentrações do surfactante no caldo de fermentação. As atividades de transfrutossilação e hidrolítica são apresentadas na Figura 8, enquanto as razões entre as mesmas são reportadas na Figura 9.

A adição de 0,5% de Tween 80® antes do início da fermentação levou a uma baixa atividade de transfrutossilação. Isso pode ter ocorrido, pois quando este surfactante fez parte da composição do meio fermentativo, ele pode ter provocado a inibição do crescimento microbiano.

Valores similares de atividade foram obtidos para o caldo fermentado sem adição de surfactante e aqueles adicionados de 0,25% de agente espumante após a filtração, cerca de 15,0 U.mL⁻¹ para a atividade de transfrutossilação e de 3,0 a 5,0 U.mL⁻¹ para a hidrolítica, indicando que essa concentração não provocou influência considerável na atividade enzimática no meio.

A adição de 0,50%, 0,75% e 1% (m/v) de Tween 80® após a filtração apresentou resultados positivos, com elevados valores de atividade de transfrutossilação, crescentes em função da concentração de surfactante adicionado, e baixos valores para a atividade hidrolítica, o que é desejável para o processo em questão. A adição de 1% (m/v) do surfactante conseguiu-se atingir máxima atividade (22,47 U.mL⁻¹) para a transfrutossilação e uma das menores atividades hidrolíticas (1,60 U.mL⁻¹).

Gopal et al. (2012) mencionaram em seus estudos que o Tween 80® pode causar mudanças na conformação de proteínas. Isso pode ter sido a razão para esse aumento das atividades de transfrutossilação das amostras estudadas. A adição de 1,5%, 2,0%, 2,5% (m/v) de Tween 80® após a fermentação ocasionou uma queda na atividade de transfrutossilação, obtendo valores de atividade próximos ao caldo que não teve adição de tensoativo. Essa queda foi mais intensa na adição de 3,0% (m/v) do surfactante, levando a uma atividade hidrolítica

maior do que da atividade de transfrutossilacção. Isso pode ter acontecido, pois ao se adicionar concentrações maiores que 1% de surfactante, ele pode ter desempenhado uma função de agente inibidor na acção da atividade de transfrutossilacção.

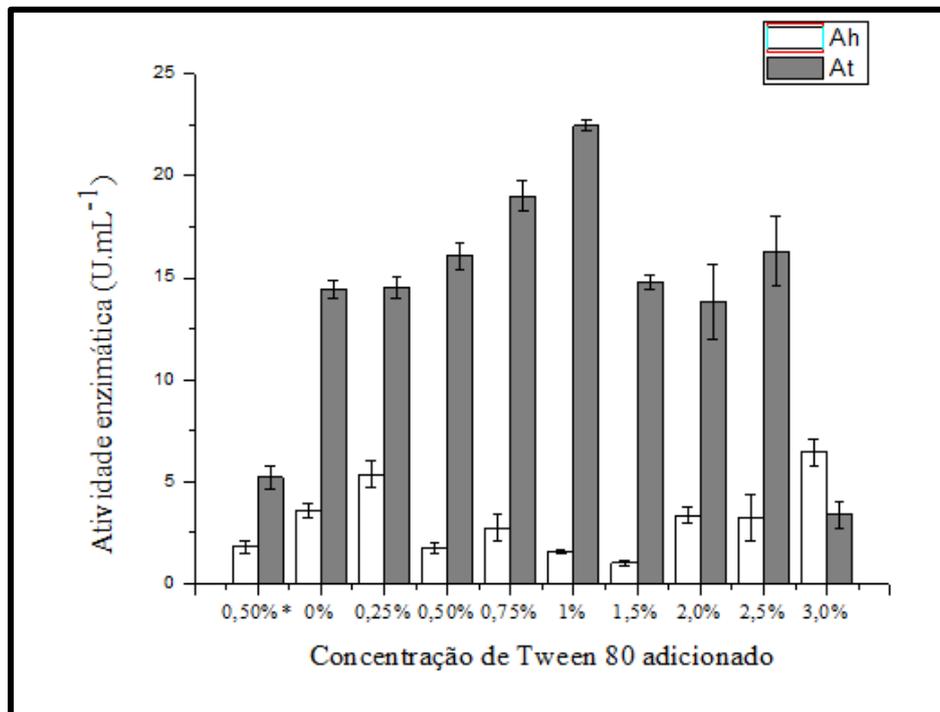


Figura 8 – Influência da concentração de Tween 80® adicionado ao caldo fermentado na atividade enzimática

Fonte: Da autora.

* adição de surfactante Tween 80® antes da fermentação

As razões entre as atividades (FIGURA 9) também foram quantificadas e corroboram os resultados citados anteriormente. Conforme mencionado anteriormente e de acordo com Hidaka et al., (1988) e Cuervo-Fernandez et al., (2007), a análise das razões entre as atividades é muito importante, pois altas conversões de sacarose em FOS são obtidas quando há elevada atividade de transfrutossilacção e baixa atividade hidrolítica. Além disso, uma elevada razão entre as atividades torna-se um fator favorável ao uso industrial da enzima (HERNALSTEENS, 2006; OLIVEIRA, 2007).

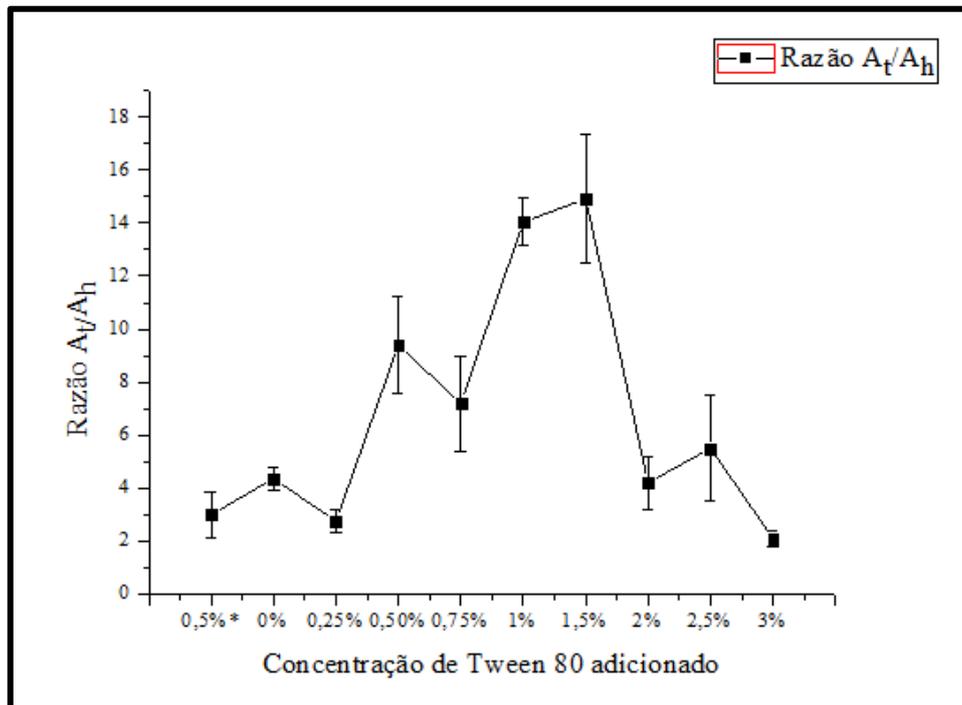


Figura 9 – Influência da concentração de Tween 80® adicionado ao caldo fermentado na razão A_t/A_h

Fonte: Da autora.

* adição de surfactante Tween 80® antes da fermentação

Apesar do máximo valor de atividade de transfrutossilacção encontrado ter sido para a adição de 1% (m/v) de surfactante, o máximo valor de razão encontrado no gráfico foi 14,92 e se deu para a concentração de 1,5% (m/v) de Tween 80® adicionado. Porém, considerando o desvio desse ponto, a concentração de 1% de surfactante pode ter sido aquela que também resultou na maior razão A_t/A_h . As menores razões se deram para o caldo com adição de 0,5% (m/v) de surfactante antes do processo fermentativo, bem como na amostra sem adição de surfactante e também nas concentrações de 2%, 2,5% e 3% (m/v) de surfactante, os quais atingiram valores de razões entre 2,1 e 5,5.

No trabalho de Cunha (2017), utilizando condições similares de meio de fermentação e quantificação das atividades, durante o processo de fermentação de 64 h, porém sem o uso de Tween 80® foi encontrado o valor de 19,76 U.mL⁻¹ para a atividade de transfrutossilacção e 1,65 U.mL⁻¹ para a atividade hidrolítica no pico da produção, obtendo uma razão de 12,22 entre as atividades, inferior à razão de 14,92 obtida no presente estudo para a adição de 1,0% (m/v) de Tween 80®.

5.3 RESULTADOS PRELIMINARES DOS TESTES OPERACIONAIS NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA

5.3.1 Características qualitativas da espuma

A partir dos resultados de concentração de agente espumante nos testes de CFE, foram estipuladas as condições para os primeiros ensaios de operação da coluna de bolhas e espuma, sem a realização ainda do estudo de separação da enzima. Os testes preliminares foram realizados em temperatura de 25°C, pH 5,5, alterando a diluição do caldo. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Características qualitativas da espuma formada de acordo com as condições de diluição e concentração de tensoativo em pH 5,5

Concentração de Tween 80® (m/v)	Condição do caldo (v/v)	Característica da espuma
0%	Sem diluição	Não houve formação de espuma estável e contínua
0,5%	Sem diluição	Espuma estável e contínua
0,5%	1:1	Espuma estável e contínua
0,5%	1:2	Espuma estável e contínua
0,5%	1:3	Espuma estável e contínua
1,0%	1:1	Espuma estável e contínua

Fonte: Da autora.

Nesses testes descritos na Tabela 6, apesar da concentração de 0,5% (m/v) de tensoativo indicar uma espuma estável e contínua mesmo em diluições maiores, foi possível notar que a espuma de topo utilizando a diluição de 1:1 (v/v) e o caldo sem diluição foram aqueles que apresentaram uma espuma mais seca no produto de topo, indicando que nessa condição houve maior drenagem ao longo da coluna, o que é um fator favorável para a separação da enzima.

5.3.2 Estudo das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma

O teste das condições operacionais da coluna foi realizado em diferentes diluições do caldo (1:1; 1:2; 1:3 e 1:4) (v/v) com as concentrações de 0,3% e 0,4% (m/v) de surfactante Tween 80® e estão indicados nas Tabelas 8 e 9. Essas concentrações foram testadas a fim de obter a mínima concentração do tensoativo para garantir a formação de uma espuma estável e contínua de modo a minimizar uma possível competição entre o surfactante e a proteína pela interface gás-líquido, bem com reduzir a possibilidade de inibição da atividade enzimática pelo mesmo. Os parâmetros estudados foram: velocidade linear de deslocamento da espuma, tempo total de processo, tempo de residência e alteração de pH na coluna de líquido. A vazão do gás nitrogênio foi sempre controlada manualmente de forma que fosse aproximadamente 1,0 L.min⁻¹. Estes parâmetros foram pouco afetados pela diluição do caldo durante os ensaios realizados.

É importante ressaltar que a faixa de pH utilizada nesse estudo foi com base nos estudos preliminares de Cunha (2017) que estudou a estabilidade frente ao pH das FTases extracelulares compreendendo uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0. De acordo com os resultados encontrados, a FTase apresenta máxima atividade de transfrutossilação entre pH 4,5 até 6,5, sendo aproximadamente 5,5 o pH do caldo de fermentação. No entanto, este pode diminuir no decorrer do processo fermentativo uma vez que o *Aspergillus oryzae* é produtor de proteases ácidas que são responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas e liberação de aminoácidos o que ocasiona a acidificação do meio (CASTRO; SATO, 2014).

Tabela 8 - Resultados das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma utilizando 0,3% de agente espumante

Condições	Diluição 1:1	Diluição 1:2	Diluição 1:3	Diluição 1:4
pH inicial	5,52	5,52	5,53	5,53
pH (15 min)	5,54	5,55	5,61	5,58
pH (30 min)	5,56	5,63	5,64	5,60
pH (45 min)	5,57	5,67	5,62	5,60
Tempo de Residência (min):	23	21	24	24
Tempo de processo (min):	45	46	42	41
Velocidade média (cm/min)	9,78	11,98	10,72	10,68

Fonte: Da autora.

Tabela 9 - Resultados das condições operacionais da coluna de bolhas e espuma utilizando 0,4% de agente espumante

Condições	Diluição 1:1	Diluição 1:2	Diluição 1:3	Diluição 1:4
pH inicial	5,50	5,50	5,51	5,51
pH (15 min)	5,52	5,53	5,51	5,57
pH (30 min)	5,52	5,54	5,52	5,58
pH (45 min)	5,55	5,56	5,54	5,60
Tempo de Residência (min):	23	24	21	19
Tempo de processo (min):	43	44	43	41
Velocidade média (cm/min)	10,76	11,21	10,41	10,68

Fonte: Da autora.

O pH manteve-se aproximadamente constante ao longo de todo o processo de separação na coluna, o que favorece o processo de separação da enzima sem que em algum momento a mesma seja submetida a pHs agressivos à sua estrutura e/ou atividade.

O tempo de residência definido como o tempo transcorrido entre o início da formação de bolhas na coluna de líquido até sua saída da coluna de espuma sofreu reduzida alteração em função das concentrações de Tween 80® e da diluição do caldo. Um tempo de residência muito curto poderia levar a pouca drenagem da coluna de líquido, não promovendo a concentração das enzimas na fase espuma.

O tempo total de processo, definido como o tempo transcorrido entre início da formação de espuma e o momento em que a mesma se apresenta instável e descontínua na coluna de bolhas ficou em torno de 45 minutos.

A velocidade média de ascensão na coluna de espuma foi calculada através da média aritmética dos tempos que a espuma gastava para percorrer cada 10 cm da coluna de espuma. A faixa de valores encontrados foi de 9,78 a 11,98 cm/min, indicando pouca variação em função dos parâmetros estudados.

5.4 ENSAIOS DE SEPARAÇÃO DA FTASE NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TWEEN 80®, DILUIÇÃO E pH

Foram realizados dez nsaios na coluna de bolhas e espuma, alterando o pH, a concentração de Tween 80® e a diluição do caldo, a fim de estudar a separação da enzima frutossiltransferase do caldo de fermentação. Nesses ensaios, as atividades de transfrutossililação e hidrolítica do caldo e da espuma, em função do tempo de processo foram determinadas como forma de avaliar o processo de separação.

Os parâmetros do processo de diluição do caldo, pH do caldo e concentração de surfactante Tween 80® também foram estudados.

5.4.1 Monitoramento da separação da FTase em função do tempo

No ensaio 1, utilizou-se concentração de 0,5% (m/v) de surfactante, diluição 1:1 (v/v) em pH 5,5. Conforme pode ser observado na Figura 10, o tempo de 40 min foi o único em que a atividade de transfrutossililação relativa, aproximadamente 1,8, foi maior do que a atividade de transfrutossililação relativa do caldo da coluna de líquidos (cerca de 1,25), indicando a obtenção de espuma com maior atividade de transfrutossililação do que o caldo na coluna de líquido. Em todos outros tempos, a A_t relativa do caldo é superior à A_t relativa da espuma ou até mesmo apresenta atividades hidrolíticas relativas superiores às atividades de transfrutossililação, o que seria um resultado indesejado para o processo.

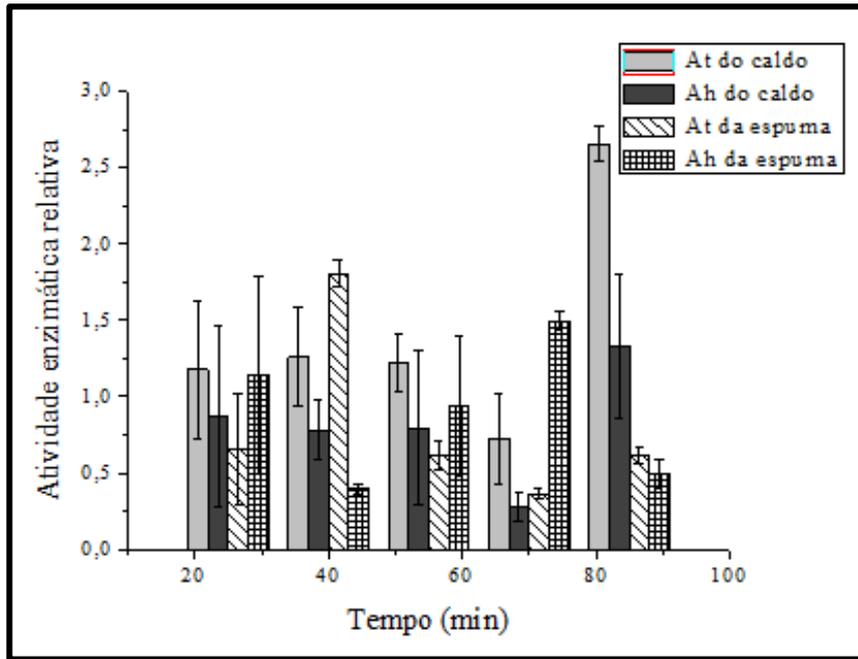


Figura 10 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 1

Fonte: Da autora.

No ensaio 2, utilizou-se concentração de 0,5% (m/v) de surfactante, caldo sem diluição em pH 5,5. Na Figura 11, observa-se que em nenhum momento a A_t relativa da espuma foi superior à A_t do caldo.

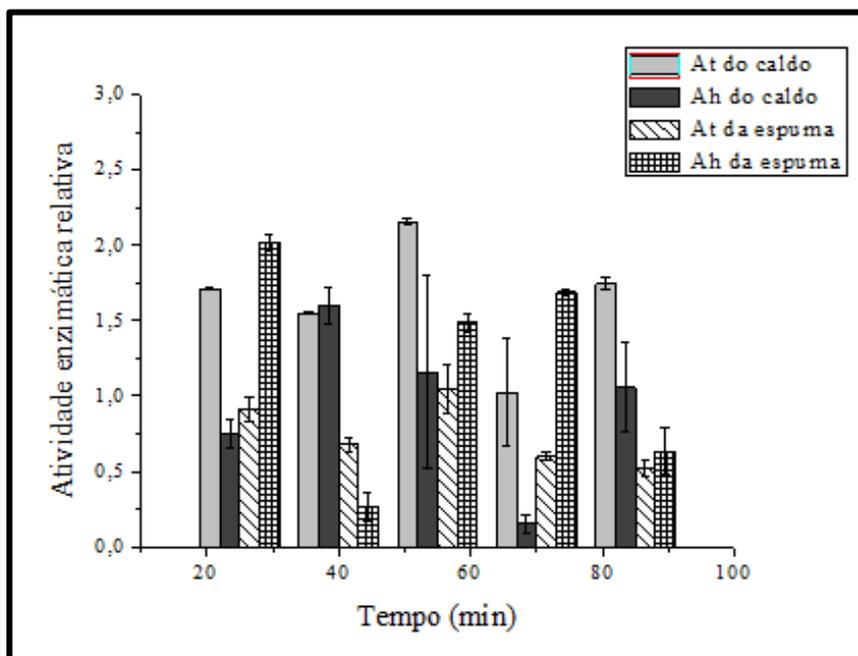


Figura 11 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 2

Fonte: Da autora.

No ensaio 3, utilizou-se concentração de 1,0% (m/v) de surfactante, diluição (1:1) em pH 5,5. É possível notar Figura 12 que há uma predominância de valores altos de atividades hidrolíticas relativas, os quais são resultados indesejados para o processo.

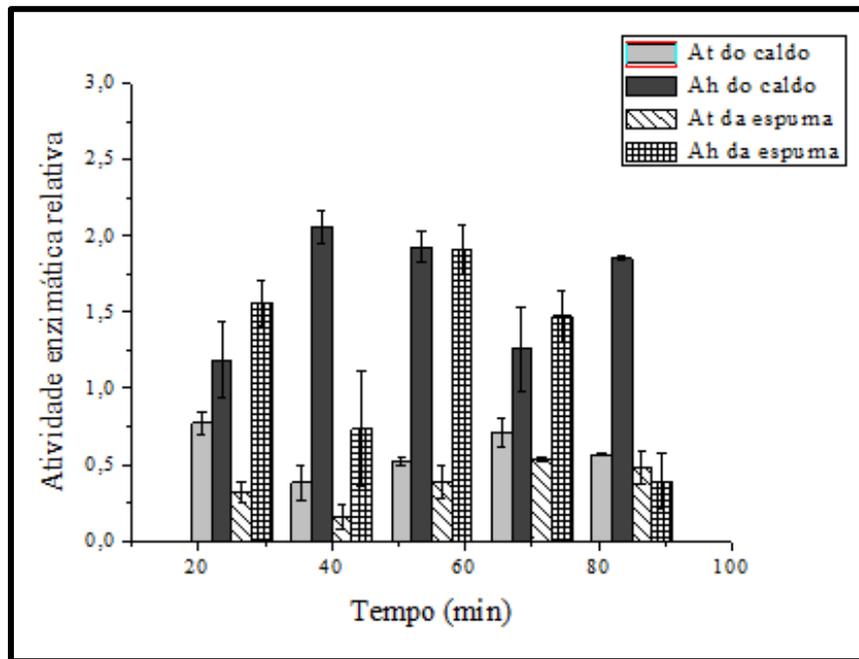


Figura 12 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 3

Fonte: Da autora.

No ensaio 4, utilizou-se concentração de 1,0% (m/v) de surfactante, caldo sem diluição em pH 5,5. Da forma similar ao ensaio 3, houve predominância de valores altos de atividades hidrolíticas relativas conforme pode ser observado na Figura 13.

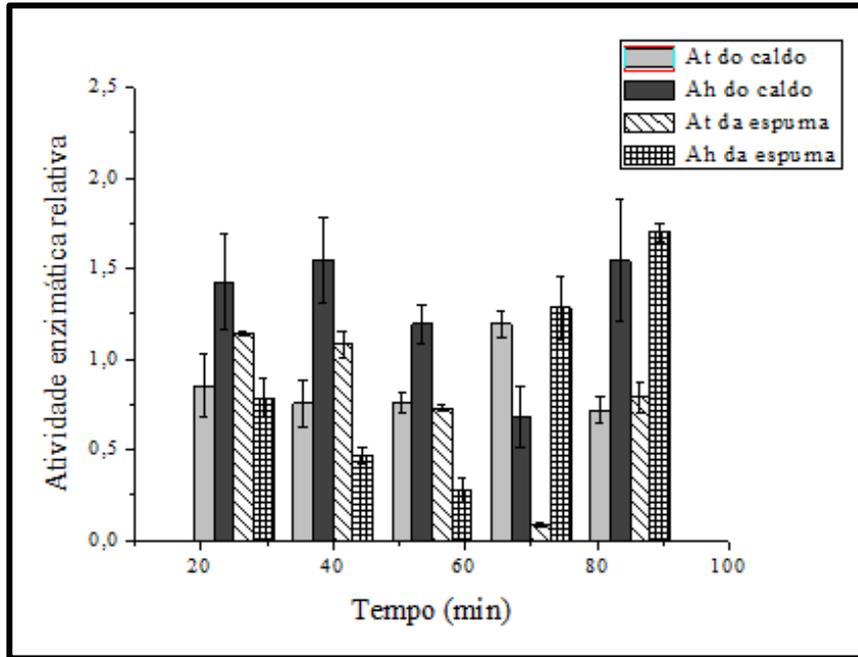


Figura 13 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 4

Fonte: Da autora.

No ensaio 5, mostrado na Figura 15, utilizou-se concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, caldo sem diluição em pH 5,5. Conforme observado nos ensaios anteriores, houve predominância de atividades hidrolíticas relativas. Esses resultados não condizem com os esperados para o processo.

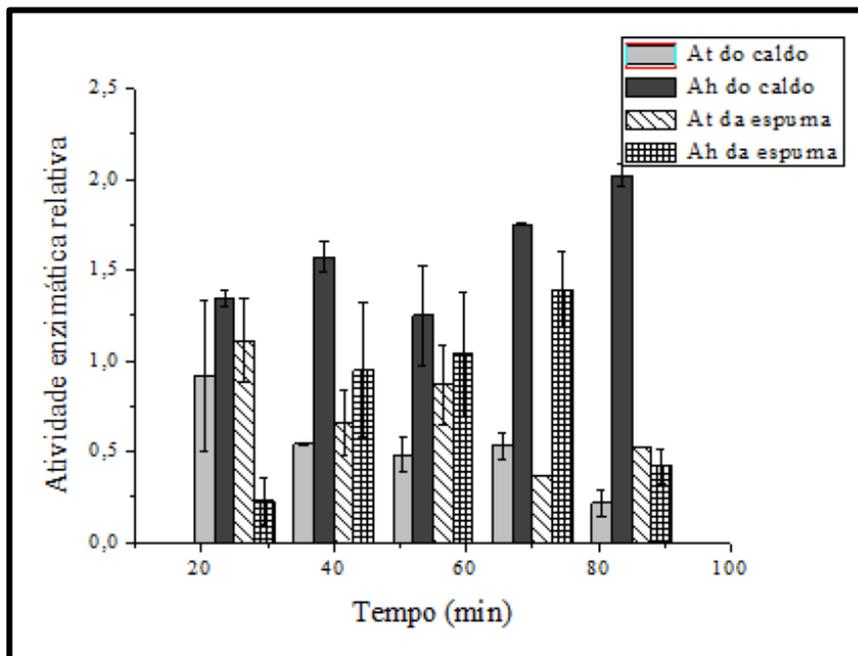


Figura 14 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 5

Fonte: Da autora.

No ensaio 6, cujos resultados são expressos na Figura 15, utilizou-se concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, diluição 1:1 (v/v) em pH 5,5. Analisando o comportamento da espuma nos dois últimos tempos é possível observar para os tempos 70 min e 85 min que as A_t relativas são superiores às A_h relativas, característica desejada para o processo em estudo.

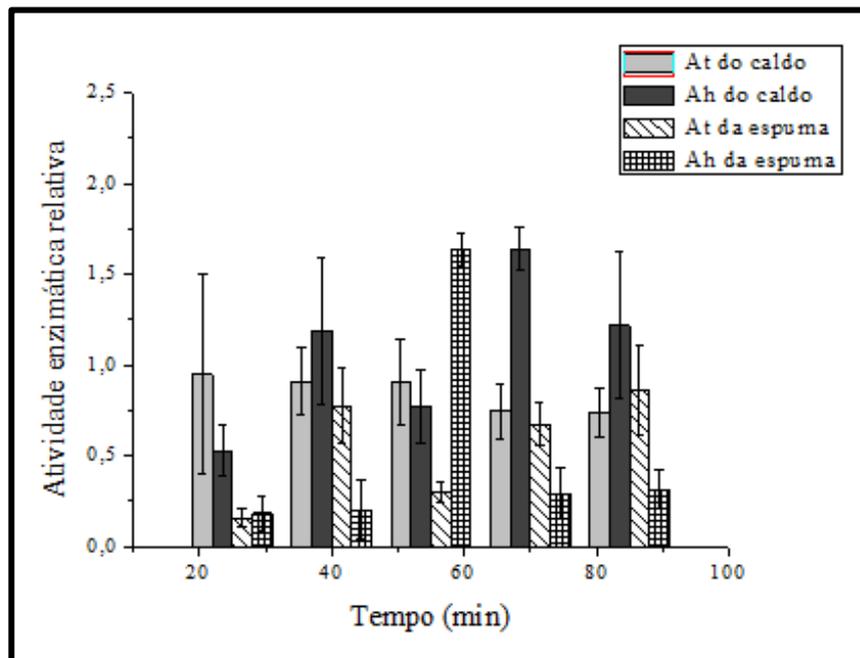


Figura 15 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 6

Fonte: Da autora.

No ensaio 7, utilizou-se concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, diluição 1:2 (v/v) em pH 5,5. A Figura 16 mostra que para 90 min de processo, o valor da A_t relativa da espuma é cerca de 1,5 vezes superior à A_t inicial do caldo fermentado.

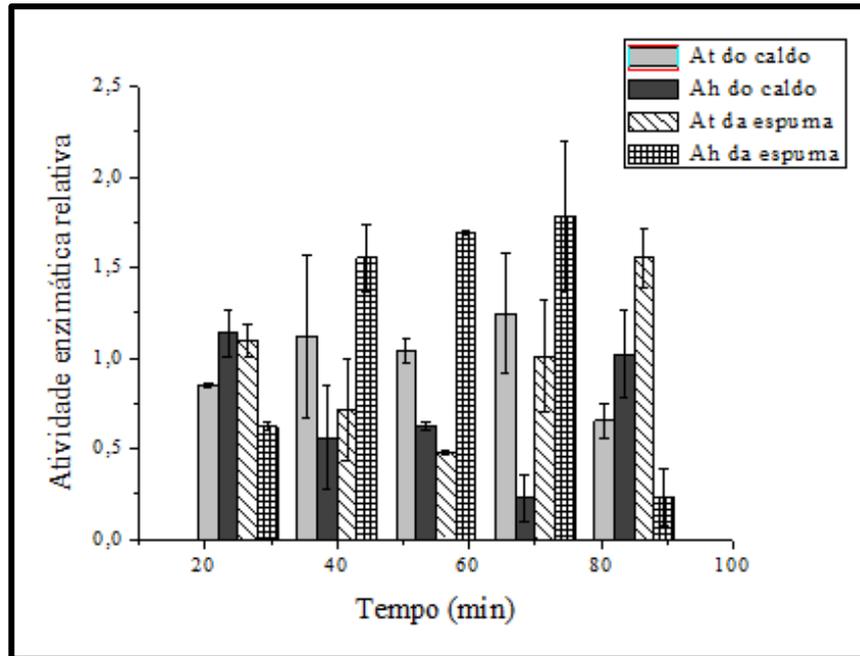


Figura 16 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 7

Fonte: Da autora.

No ensaio 8, foram empregados como parâmetros do processo de separação: concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, diluição 1:3 (v/v) em pH 5,5. A partir da análise da Figura 17, observa-se que os valores de A_h relativa foram superiores aos valores de A_t relativa na espuma.

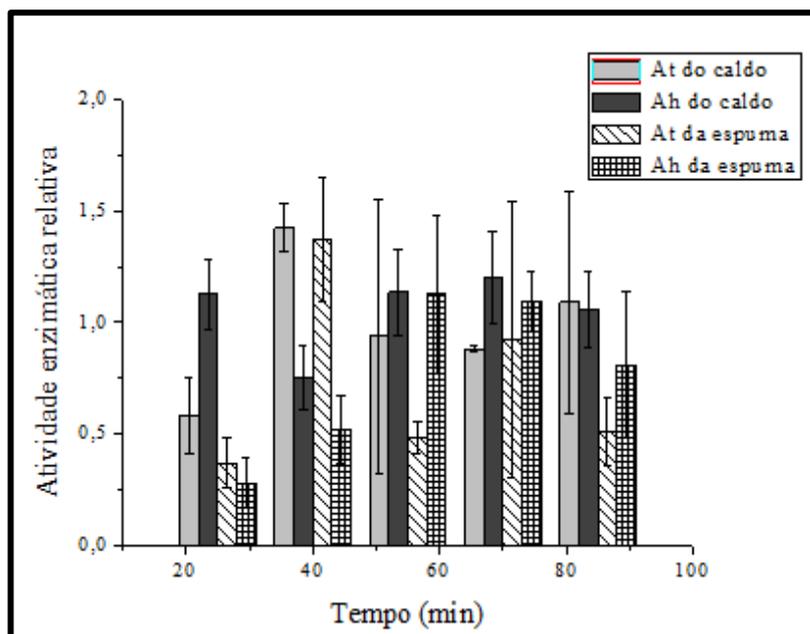


Figura 17 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 8

Fonte: Da autora.

No ensaio 9, utilizou-se concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, caldo sem diluição em pH 6,5. A análise da Figura 18 mostra uma considerável redução no valor das atividades enzimáticas, no caldo e na espuma, indicando que o pH pode ter acontecido influência direta na redução deste parâmetro. Nenhum valor de A_t relativa da espuma foi superior ao valor de A_h relativa da mesma.

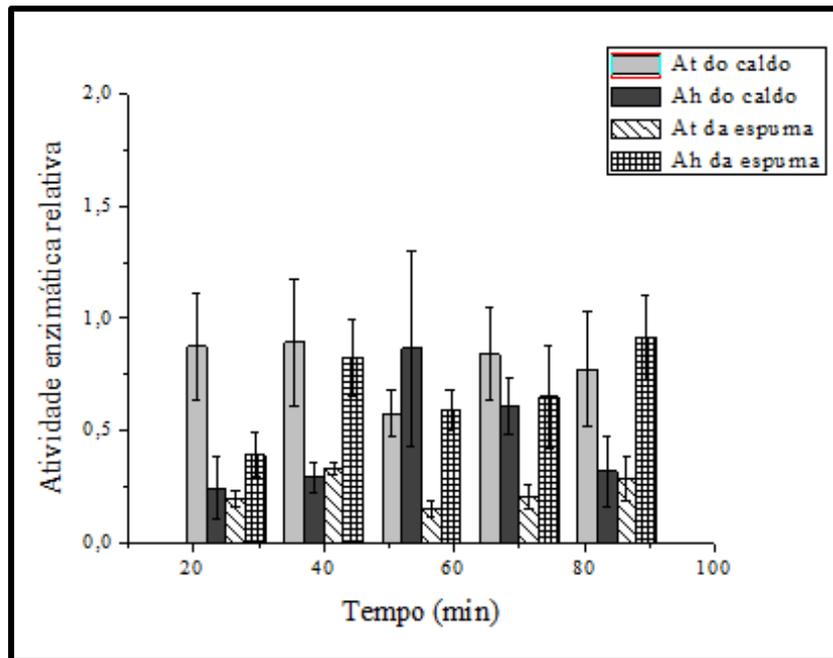


Figura 18 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 9

Fonte: Da autora.

No ensaio 10, utilizou-se concentração de 1,5% (m/v) de surfactante, caldo sem diluição em pH 7,5. É possível observar a partir da Figura 19 uma predominância de altos valores de A_h relativa na espuma em todos os casos, característica indesejável para o processo.

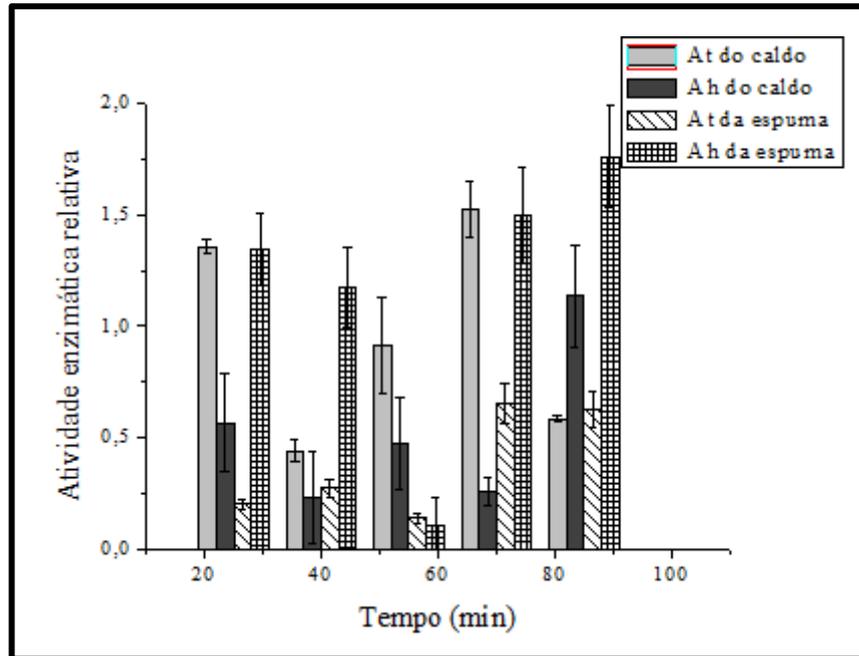


Figura 19 – Atividades enzimáticas relativas do caldo fermentado e da espuma no ensaio 10

Fonte: Da autora.

Os resultados obtidos foram diferentes do esperado e pode ser observado um elevado desvio nos mesmos, bem como a ausência de uma tendência para os resultados do processo de separação. Dentre as possíveis causas, podem ser elencadas destacar o elevado desvio analítico bem como uma possível alteração na atividade enzimática causada por alterações no pH e/ou pela concentração de surfactante.

5.4.2 Separação global da FTase entre a coluna de líquido e o leito de espuma

A Figura 20 possibilita a comparação do efeito da diluição do caldo de fermentação na coluna de bolhas e espuma, mantendo-se constantes a concentração de surfactante e pH, 1,5% e 5,5, respectivamente.

Analisando a atividade de transfrutoseilação relativa da espuma em relação à do caldo final na coluna de líquidos, observa-se que o ensaio 7 foi aquele que apresentou a maior atividade para a espuma, ao mesmo tempo em que apresentou atividade um pouco superior à do caldo final. O processo de separação nas diluições 1:1 e 1:2 (ensaio 6 e 7, respectivamente), apresentaram resultados similares quanto as atividades relativas, para o

caldo final e para a espuma, enquanto na diluição 1:3 (ensaio 8) apresentou a maior atividade no caldo final, o que mostraria uma maior quantidade de enzimas com atividade de transfrutossilação no caldo final do que a fracionada na espuma, característica indesejável para o processo. É importante ressaltar que nesse ensaio, o desvio da A_t relativa do caldo é muito alto, o que torna difícil afirmar tal análise com segurança.

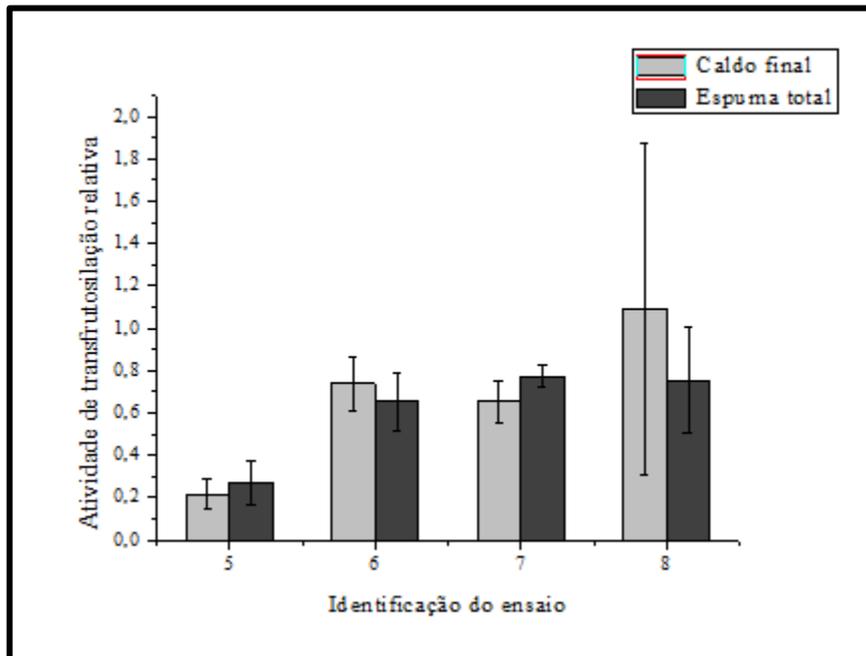


Figura 20 – Efeito da diluição nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante o pH (5,5) e a concentração de surfactante (1,5%) (m/v) e variando a diluição. Os ensaios 5, 6, 7 e 8 representam caldos sem diluição, 1:1, 1:2 e 1:3 (v/v), respectivamente.

Fonte: Da autora.

A Figura 21 mostra o efeito do pH no processo de separação na coluna de bolhas e espumas, em ensaios realizados em caldos não diluídos e adicionados de 1,5% de surfactante.

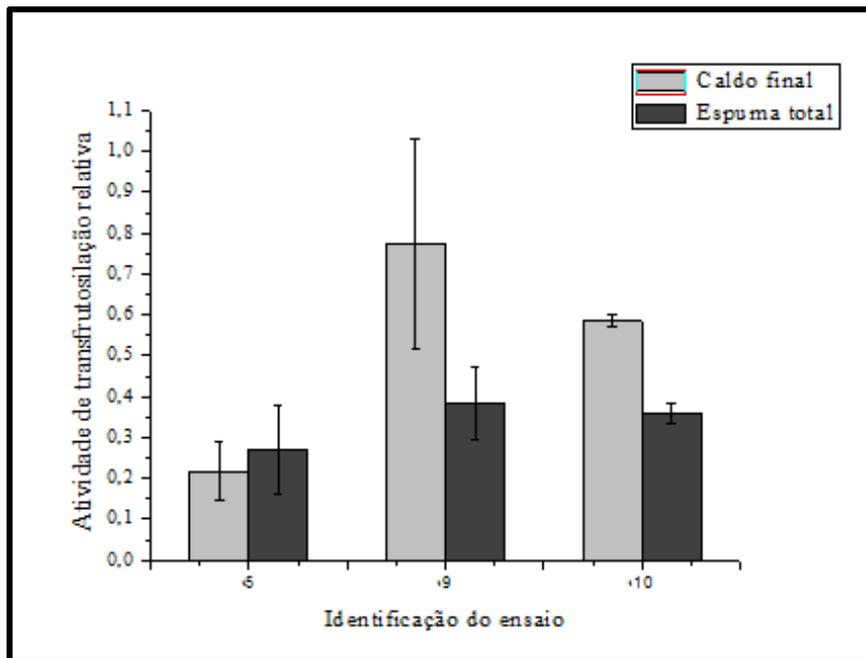


Figura 21 – Efeito do pH nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante caldos sem diluição e a concentração de surfactante (1,5%) (m/v) e variando o pH. Os ensaios 5, 9 e 10 representam pHs 5,5, 6,5 e 7,5 respectivamente.

Fonte: Da autora.

Pode-se observar que, apesar de uma menor atividade relativa de transfrutossilacção no ensaio 5 (pH 5,5), foi o único em que a atividade de transfrutossilacção relativa da espuma total foi maior do que do caldo final da coluna de líquidos, fator desejado para o processo de separação em coluna de bolhas e espuma. Esta maior atividade pode estar relacionada a uma maior adsorção da enzima FTase no pH 5,5 do que aos pHs 6,5 e 7,5. Tais resultados condizem com o trabalho de Cunha (2017) em que foi estudado o efeito do pH em *Aspergillus oryzae* IPT-301 e determinou-se que a máxima atividade de transfrutossilacção no caldo fermentativo se dava para uma faixa de pH entre 4,5 e 6,5.

A Figura 22 compara o efeito da concentração de surfactante adicionado ao caldo fermentado sem diluição, em pH 5,5 na coluna de bolhas e espumas.

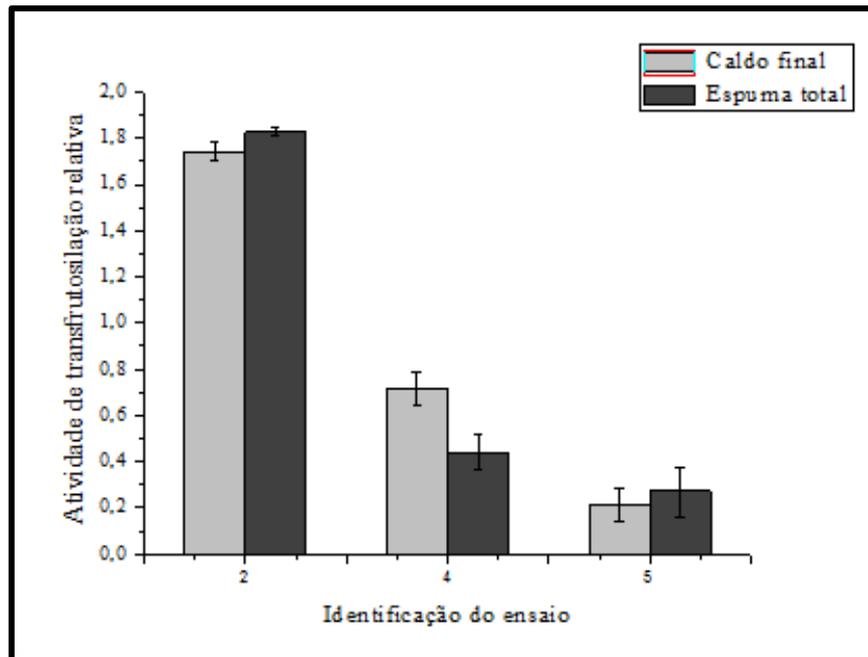


Figura 22 – Efeito da concentração de surfactante nos ensaios da coluna de bolhas e espuma mantendo constante caldos sem diluição em pH 5,5. Os ensaios 2, 4 e 5 representam concentrações de Tween 80® de 0,5%, 1% e 1,5% (m/v), respectivamente.

Fonte: Da autora.

Pode-se observar que os resultados dos ensaios 2 e 5, os quais adicionou-se 0,5% e 1,5% (m/v), respectivamente, resultou em maiores atividades de transfrutosilação na espuma se comparada às atividades no caldo final.

A Figura 23 mostra o efeito da concentração de surfactante adicionado ao caldo fermentado diluído 1:1 (v/v). Em todas as concentrações do agente espumante, a atividade de transfrutosilação na espuma mostrou-se menor do que a no caldo final remanescente na coluna de líquidos, o que mostraria uma reduzida separação da enzima do caldo de fermentação.

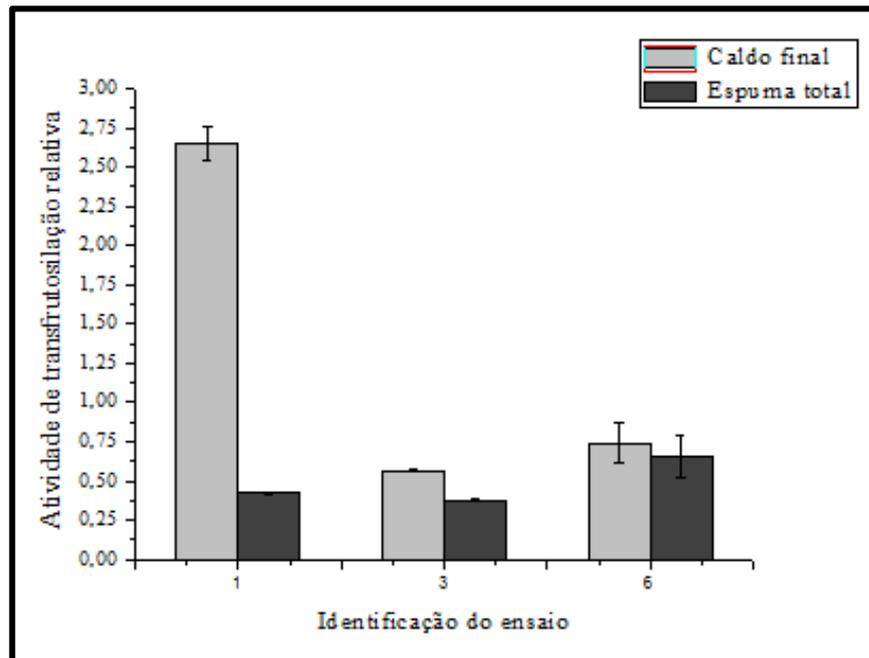


Figura 23 – Efeito da concentração de surfactante na coluna de bolhas e espuma mantendo constante caldos com diluição 1:1 (v/v) em pH 5,5. Os ensaios 1, 3 e 6 representam concentrações de Tween 80® de 0,5%, 1% e 1,5% (m/v), respectivamente.

Fonte: Da autora.

A partir dos ensaios realizados, as condições operacionais mais indicadas para a separação das enzimas com atividade de transfrutosilação na coluna de bolhas e espuma seriam a adição de 1,5% e 0,5% de surfactante, respectivamente, nos caldos com diluição 1:2 e sem diluição, em um pH de 5,5. Estas condições de separação resultaram em atividades de transfrutosilação relativas de 0,8 e 1,8, respectivamente, para os ensaios 7 e 2, com ambos apresentando atividades relativas 10% maior na espuma total do que no caldo.

5.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS ENSAIOS NA COLUNA DE BOLHAS E ESPUMA

As quantificações de proteínas são frequentemente realizadas usando o método de Bradford. Este é um método rápido, simples e relativamente livre de interferências, porém o surfactante Tween 80® utilizado nesse trabalho é um interferente desse método. O Tween 80® pode se associar na interface da proteína e interferir na análise ou até mesmo fazer com que a proteína se dissocie em formas menores que são discerníveis também no método de HPLC por exclusão de tamanho molecular (STUTZENBERGER, 1992).

A determinação da atividade de transfrutosilação na espuma e na coluna de líquidos, possivelmente pode ter vindo a causar distorções na avaliação da separação das enzimas na coluna de bolhas e espuma.

As concentrações de Tween 80® são bastante distintas no caldo e na espuma, uma vez que este provavelmente venha a se concentrar na fase espuma, pois é um dos constituintes, juntamente com uma pequena quantidade de água, do filme que leva à formação das bolhas. Conforme observado pelos ensaios descritos no Tópico 4.2.3, a atividade de transfrutosilação é muito influenciada pela concentração de surfactante. Deste modo, ao se medir atividades no caldo final e na espuma total, estariam sendo realizadas medições da atividade enzimática em meios com concentrações muito diferentes de surfactante, o que leva a uma fonte significativa de erro na comparação das atividades nos dois meios.

A Tabela 10 (APÊNDICE B) apresenta as concentrações totais de proteínas do caldo inicial, caldo final remanescente na coluna de líquidos e espuma total dos 10 ensaios realizados na coluna de bolhas e espuma, quantificadas por meio do método Dumas, conforme descrito no Tópico 4.2.4.

Os resultados não apresentaram uma correlação lógica entre as concentrações de proteínas no caldo inicial, caldo final e espuma total. Nos ensaios 2, 3, 6, 7 e 8 a concentração de proteína no caldo inicial mostra-se inferior ao do caldo final. Uma vez que a quantidade de líquido removido do caldo na coluna de líquidos é muito pequena, não há uma concentração considerável em termos de redução da concentração de água do caldo inicial para o caldo final. Deste modo, não se considera que haja um aumento da concentração de proteínas no caldo final em relação ao caldo inicial. Na hipótese de uma total ineficiência da separação, estes valores seriam aproximadamente os mesmos.

Adicionalmente, a despeito do comportamento inconstante do processo fermentativo, não é esperada uma alteração tão elevada da concentração de proteínas no caldo inicial como observada nos ensaios realizados.

O principal fator que pode ser creditado para aos resultados discrepantes encontrados para as análises de proteína é a concentração reduzida de proteínas encontrado em um caldo de fermentação pode ter levado à realização da análise em valores próximos ou inferiores ao limite de quantificação do equipamento, cujo valor é 0,003 mgN (CQA Química, 2018)

Adicionalmente, a presença de Tween 80® em determinadas concentrações pode levar a um processo de mudança na conformação da enzima, ou até mesmo sua desnaturação irreversível, o que pode contribuir com a degradação da mesma, interferindo na concentração de proteína nos sistemas em estudo.

A estocagem do caldo em congelador, previamente à determinação da concentração de proteínas também pode ter contribuído para a degradação proteica uma vez que no caldo de fermentação também foi detectada atividade hidrolítica.

O estudo de desnaturação da proteína em espuma tem implicações significativas em uma vasta gama de operações tanto na biotecnologia como na indústria de bebidas. Danos devido à formação de espumas nesses processos podem significar redução significativa no valor do produto final (Clarkson et al., 1999)

A causa principal pela qual as moléculas de proteínas são desnaturadas na espuma é devido à desnaturação da superfície na interface gás-líquido. Uma parte das moléculas adsorvidas não voltam ao seu estado nativo quando elas são desorvidas. Clarkson et al. (1999) descreve em seu artigo que experimentos mostraram que cerca de 10% de moléculas de BSA que haviam sido adsorvidas na superfície permaneciam desnaturadas quando desorvidas. Para a pepsina, esse valor foi cerca de 75%.

Na literatura, são descritos três possíveis mecanismos pelos quais as moléculas de proteína podem ser danificadas em espuma. Primeiro, há o desdobramento da molécula na interface gás-líquido que pode não ser reversível. Portanto, algumas moléculas que sofreram desnaturação permanecerá desnaturada após a desorção. A proporção de moléculas que permanecem desnaturadas dependerá até que ponto as moléculas se desdobraram na interface. Em segundo lugar, o dano pode ser devido a altas taxas de cisalhamento que causam mudança na estrutura através de diferenças de tensão através da molécula de proteína. Há também a possibilidade de ocorrer dano químico causado pela oxidação. Porém, estudos concluíram que o principal mecanismo de dano proteico na formação de espuma era a desnaturação da

superfície. As taxas de cisalhamento e a oxidação não contribuem significativamente ao dano (Clarkson et al., 1999).

Deste modo, são apresentados os resultados da concentração de proteínas apenas a título de registro da realização das análises, não tendo sido a mesma considerada na efetiva discussão dos resultados.

6 CONCLUSÕES

Os parâmetros velocidade linear na coluna, tempo de residência, tempo de processo se apresentaram valores aproximadamente constantes, independente das condições de ensaio na coluna de bolhas e espuma.

A adição de concentrações entre 0,5% e 1,0% de Tween 80® ao caldo foi necessária para que fosse produzida uma espuma contínua e estável, de modo a viabilizar a realização dos ensaios de separação na coluna de bolhas e espuma.

Foi verificado um aumento da atividade de transfrutossilação no caldo de fermentação até a adição de cerca de 1,0% de Tween 80®, o que viria a favorecer a produção de FOS, e um decréscimo na mesma a partir de uma concentração de 3,0% de surfactante.

As condições operacionais mais indicadas para a separação das enzimas com atividade de transfrutossilação na coluna de bolhas e espuma foram em pH 5,5. A adição de 1,5% de surfactante com diluição 1:2 (v/v) resultou em A_t relativa de 0,8. Já a adição de 0,5% de Tween 80®, no caldo sem diluição, resultou em A_t relativa de 1,8.

O método Dumas, para determinação de proteínas, mostrou-se inadequado para a determinação da concentração de enzimas nos sistemas estudado, muito provavelmente devido a concentração destas serem inferior ao limite de quantificação do equipamento.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade do trabalho:

- a) Utilizar uma coluna de bolhas e espumas de pequeno porte;
- b) Estudar diferentes tipos de surfactantes na coluna de bolhas e espumas;
- c) Analisar proteínas totais pelo método de Lowry;
- d) Analisar a concentração de surfactante na espuma.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.I. Laws of foam formation and foam fractionation, I and II. **Separation Science**, v. 10, n. 6, p. 637-700, 1975.
- ALVARADO-HUALLANCO, M. B.; MAUGERI FILHO, F.. Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, n. 6, p. 1043 , 2011.
- ANDREWS, G., SCHÜTZ, F. Differential adsorption of pepsin and rennin on foam. **Biochemical Journal**, v. 39, p. li–lii, 1945
- ANTOŠOVÁ, M; POLAKOVIČ, M. Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v. 55, n. 6, 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.
- AKSAY, S. Optimization of protein recovery by foam separation using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 598–606, 2007.
- AMRENDRA K. et al. Biotransformation of sucrose by using thermostable and alkaline fructosyltransferase enzyme isolated. **International Journal of Science Environment**, v. 3, p. 708–713, 2014.
- ARTHEE R. Study on fructosyltransferase enzyme from *Aspergillus* sp. In fructooligosaccharides production. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 3 p. 147–153, 2014.
- BADER, R.; SCHULTZ, F. Fractionation by adsorption and crystallization on foam, part III, experiments with bile salts. **Transactions of the Faraday Society**, v.42, p.571-576, 1946.
- BALKEN, J. A. M. et al. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose 1^F-fructosyltransferase. **Appl. Microbial. Biotechnol**, v. 35, p. 216 321, 1991.
- BEZELGUES, J. Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants. **Colloids and Surfaces**, A 331, p. 56–62, 2008.
- BHATIA, I.S. et al. Studies on fructosyltransferase from *Agave 73mericana*. **Phytochemistry** v. 18, p. 923-927, 1979.
- BHATTACHARJEE, S. et al. Prediction of separation factor in foam separation of proteins. **Chemical Engineering Science**, v. 52 n. 24, p. 4625–4636, 1997.
- BROWN, L.; NARSIMHAN, G.; WANKAT, P. C. Foam fractionation of globular proteins. **Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 947–959, 1990.

- BROWN, A.K., et al. Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of β -casein. **Biotechnology and Bioengineering** v. 62, p. 278–290, 1999.
- BURAPATANA, V. et al. Enhancing cellulase foam fractionation with addition of surfactant. **Applied biochemistry and biotechnology** v. 121–124, p. 541–52 , 2005.
- BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**, v. 161, n. 2, p. 126–137, 2012.
- CAMPESTRINI, E. et al. Utilização De Enzimas Na Alimentação Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.
- CASTRO, R. J. S.; SATO, H.H. Protease from *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.
- CHAI, J. , et al. Effect of bubble velocity and pH step changes on the foam fractionation of sporamin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2868–2872, 1998.
- CHANDORKAR, K. R. et al. Synthesis of fructooligosaccharides in leaf disks of certain *Asteraceae*. **Can. J. Bot**, v. 50, p. 295-303, 1974.
- CHARM, S.E., et al. The separation and purification of enzymes through foaming. **Analytical Biochemistry**, v. 15, p. 498–508, 1966.
- CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153–160 , 1996.
- CLARKSON, J.; et al. Protein Denaturation in Foam. **Journal of colloid and interface science**, v. 215, n. 2, p. 333–338 , 1999.
- CQA Química. **Analisadores de nitrogênio e proteína**. Disponível em: <<http://site.cqaquimica.com.br/wp-content/uploads/2015/05/Analísadores-de-Nitrogenio-e-Proteina.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- 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 03 dez. 2017.
- 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.
- CUNHA, J. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de aspergillus**

oryzae ipt-301 visando a obtenção de fructooligossacarídeos. 2017. 98 f. (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

DAHECH, I. et al. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 3, p. 329–335, 2012.

DHAKE, A. B. Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 194-199, 2007.

DICKERSON, A. G. β -D-fructofuranosidase from *Claviceps purpurea*. **Biochem. J.**, v. 129, p. 263-272, 1972.

DOMINGUEZ, A. et al. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1174–1179, 2012.

_____. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1–14, 2013.

DUAN, K. J., et al. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 334-339, 1994.

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Review: Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. **Maturitas**, v. 75, p. 44–50, 2013.

FAO/OMS. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. **FAO Food and Nutrition Paper**, n.85, 2006.

FIGUEREDO, R. C.R.; RIBEIRO, F. A.L.; SABADINI, E. Ciência de espumas - Aplicação na extinção de incêndios. **Quimica Nova**, v. 22, n. 1, p. 126–130, 1999.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Efeitos da suplementação dietética com fructooligossacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Ciência Saúde**, v. 20, n. 3, p. 241–252, 2010.

FUJITA, K., et al. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, p. 913-919, 1990.

GANAI, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S.. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2143–2159, 2014.

GERKEN B.M., et al., Effective enrichment and recovery of laccase using continuous foam fractionation, **Sep. Purif. Technol.**, v. 49, p. 291–294, 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, 2007.

GOPAL, R. et al. Applications of Circular Dichroism for Structural Analysis of Gelatin and Antimicrobial Peptides. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3229-3244, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Production and characterization of a thermostable extracellular β -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as

carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 52–57, 2007.

HAYASHI, S. et al. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 395–399, 1990.

HEBETTE, C.L.M. et al. Complex melting of semicrystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. **Carbohydrate Research**, v. 310. p.65–75, 1998.

HENRY, R. J. et al. Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. **Phytochemistry**, v. 19, p.1017-1020, 1980.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. 2006. 184f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HIDAKA, H. et al. Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v. 5 p. 37–50, 1986.

_____. A fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52. p.1181–1187, 1988.

HOLMSTRÖM, B., Foam concentration of streptokinase from crude culture filtrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p. 551–552, 1968.

IUBMB. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2018. **ExploEnz**. Disponível em: < <http://www.enzyme-database.org/>> Acesso em 15 mar. 2018.

JUNG, K. H., et al. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microb. Technol**, v. 11, p. 491-494, 1989.

KIDA, M., et al. Formation of fructooligosaccharides from sucrose catalyzed by immobilized β -fructofuranosidase originated from *Aspergillus oryzae*. **Nippon Kagaku Kashi.**, v. 11, p. 1830-1835, 1988.

KIM, B.W. et al. Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.11–16, 2000.

KINOSHITA, T. et al. Selective recovery of gallium with continuous counter-current foam separation and its application to leaching solution of zinc refinery residues. **Separation and Purification Technology**, v.78, p. 181–188, 2011.

KUMAR, H. et al. Novel probiotics and prebiotics: Road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 99–103, 2015.

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 45, p. 236–239, 1996.

LALCHEV, Z., et al. Foam separation of DNA and proteins from solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 2253–2262, 1982.

- 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, n. 5, p. 1067–1070 , 2007.
- LEE, K; et al. Purification and properties of intracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **World Journal od Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 411–415 , 1992.
- 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.
- LIM, J. S. et al. Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 639–644 , 2005.
- LINKE D., et al., A laccase isolation by foam fractionation-new prospects of an old process, **Enzyme Microb. Technol**, v. 40, p. 273–277, 2007.
- LIU, Z. et al. Two-stage foam separation technology for recovering potato protein from potato processing wastewater using the column with the spiral internal component. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 2, p. 192–198 , 2013.
- LUCENA, S. L. **Efeito do refluxo externo no fracionamento de soluções diluídas de proteínas em colunas de bolhas e espuma**. 1995. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- 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.
- MACIEL, T.C. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido a partir de *Melanoporia* sp e *Mucor cinneloides* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato** 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- MATOUQ, M. Investigation of the bubble foam separation technique to extract protein from whey. **American Journal of Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 468–472, 2008.
- MERZ, J., et al. Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsis cinerea* by adsorptive bubble separation. **Separation and Purification Technology**, v. 69, p. 57–62, 2009.
- MUKHOPADHYAY G. et al., Protein removal from whey waste by foam fractionation in a batch process, **Separation Science and Technology**, v. 45:9, p. 1331-1339, 2010.
- MUNJAL, U. et al. Fermentation products of inulin-types fructans reduce proliferation and induce apoptosis in human colon tumour cells of diferents stages of carcinogenesis. **British Journal of Nutrition**, v.27, p.1-9, 2009.

- MURAMATSU, M., et al. Structures of some fructooligosaccharides produced from sucrose by mycelia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. **Agric. Biol. Chem**, v. 52, p. 1303- 1304, 1988.
- MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 154–157 , 2010.
- 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.
- NAGAMATSU, Y. et al. Identification of 1-kestose- and neokestose based oligofructans in *Lycoris radiata* herb tissues. **Agric. Biol. Chem**, v. 54, p. 1291-1292, 1990.
- NINESS K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1402–1406, 1999.
- NOBLE, M.; et al. Protein recovery using gas–liquid dispersions. **Journal of Chromatography**, n. 711, p. 31–43, 1998.
- 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.; PICCOLI, R M; MOREIRA, R. Media optimization for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 49–59 , 2012.
- PARK, J. P.; et al. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 471–476 , 2001.
- PATEL, V. et al. Production of fructooligosaccharides by *usarium oxyporum*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 1139-1144, 1994.
- _____. Deglycosylation of fructosyltransferase and invertase from *Fusarium oxysporum* decreases stability but has little effect on kinetics and synthetic specificity. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 1, p. 75-77, 1997.
- PATIL M. B., BUTLE A. Fructosyltransferase production by indigenously isolated *Syncephalastrum racemosum*. **Journal of Global Biosciences**, v. 3, p. 597-603, 2014.
- PERNA, R. F. **Fracionamento de Surfactina em Coluna de Bolhas e Espuma.** 2010. 168f . Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Univeridade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

- PIRES, E. A. et al. Perfil dos documentos de patente referentes a tecnologias e produtos probióticos, prebióticos e simbióticos na América Latina. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 1, p. 142-149, 2015.
- POOL-SOBEL, B.L.; SAUER, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. S2580-S2584, 2007.
- dos PRAZERES, J.N., et al. Recovery of extracellular alkaline lipases of *Fusarium* sp. by foam fractionation. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, p. 1503–1508, 2007.
- PRAZNIK, W. et al. Isolation and characterization of sucrose 1^F- β -D-fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, p. 2429-2431, 1990.
- PROKOP, A.; TANNER, R. D. Foam fractionation of proteins: Potential for separation from dilute starch suspensions. **Starch**, v. 44, p. 150–154, 1993.
- RABIEE, H. et al. Enhancement in permeation and antifouling properties of PVC ultrafiltration membranes with addition of hydrophilic surfactant additives: Tween-20 and Tween-80. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 4050–4061, 2016.
- RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A Z. Application of foam column as green technology for concentration of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 701–709, 2013.
- 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, n. 3, p. 830-837, 2007.
- ROBERFROID M., GIBSON G.R, HOYLES L. *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br. J. Nutr.**, v.104, p. S1–S63, 2010.
- ROSA, P.T.V. **Fracionamento de proteínas e outros tensoativos em colunas de bolhas e de espuma**. 1996. 201f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.
- SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics: Prospects for public health and nutritional recommendations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1309, n. 1, p. 19–29, 2014.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyltransferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1085–1088, 2005.

SANTANA, C.C. Adsorptive bubble separation processes as a means of reducing surface active contaminants in industrial wastewaters. **Revista Brasileira de Engenharia – Química Especial**, v.5, p.01-74, 1994.

SANTOS-MAIORANO, 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.

SATYANARAYANA, M. N. Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz*. 1. Properties of a partially purified transfructosylase. **Indian J. Biochem. Biophys**, v.13, p. 261-266, 1976.

SCHNEPF, R.W., et al. Foam fractionation: metals. **Chemical Engineering Progress**, v.55, n.5, p.42-46, 1959.

SHEA, A.P., et al. Foam fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from a whey solution. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 4, p.191–203, 2009.

SHIOMI, N. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1^F-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis*). **Carbohydr. Res.**, v. 99, p. 157-169, 1982.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de fructooligosacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

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.

SLIVINSKI, C. T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. p. 128, 2007.

de SOUSA, A.; ALMEIDA, I. Guerra ao açúcar ameaça anos de crescimento do mercado. **Bloomberg/Nova Cana**. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/acucar/mercado/guerra-acucar-duvida-crescimento-mercado/>. Acesso em 20 maio 2017.

STOWERS, C.C., et al. Effect of air flow rate on the foam fractionation of a mixture of egg white and egg yolk. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering** v. 4, p. 180–183, 2009.

STUTZENBERGER, F. J. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. **Analytical Biochemistry**, v. 207, n. 2, p. 249–254, 1992.

- URAZEE, F., NARSIMHAN, G. Foam fractionation of proteins and enzymes: I. Applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p. 232–233, 1990.
- USAMI, S. et al. Production of β -fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 4, p. 303–305, 1991.
- VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A.S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa** p. 1–59, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/4779/1/Bp-023.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2017.
- 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.
- VIEIRA, A. et al. Metodologias para determinação de nitrogênio. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.
- WANG, T. Synthesis of Neofructooligosaccharides. **Organic Chemistry Insights**, p. 1-22, 2015.
- WONG, C. H., HOSSAIN, M. M., DAVIES, C. E. Performance of a continuous foam separation column as a function of process variables. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 24, p. 73–81, 2001.
- XU, Q. et al. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1237–1246, 2014.
- 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.
- _____. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.
- ZENG, X. A. et al. Preparation of fructooligosaccharides using *Aspergillus niger* 6640 whole-cell as catalyst for bio-transformation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1072–1079, 2016.
- ZHANG F., et al. Effect of ionic strength on the foam separation of nisin from the fermentation broth. **Separation and Purification Technology**, v.78, p. 42–48, 2011.

APÊNDICE A - Curvas analíticas

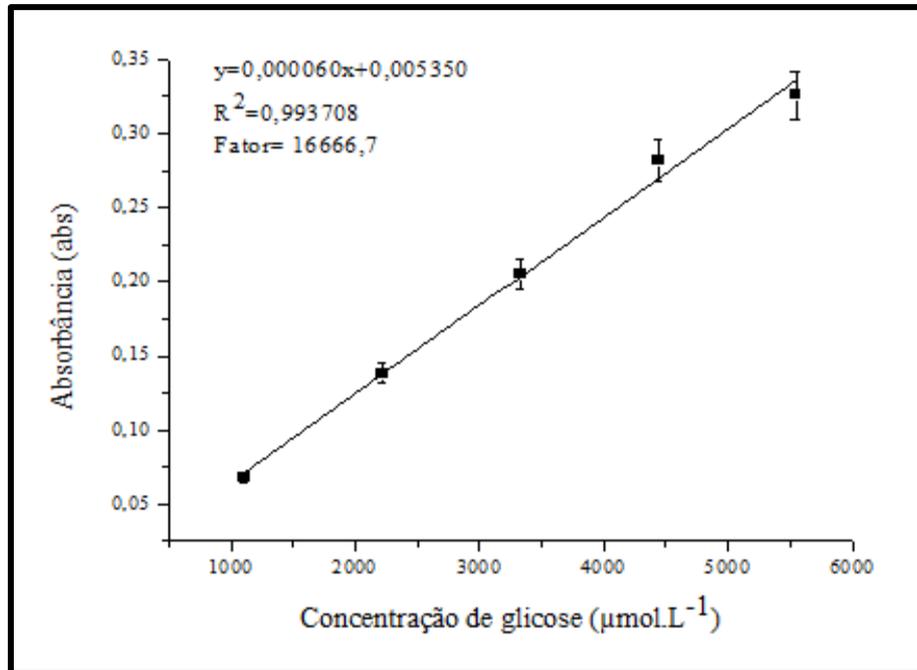


Figura 24 – Curva analítica do método GOD-PAP para a determinação de glicose

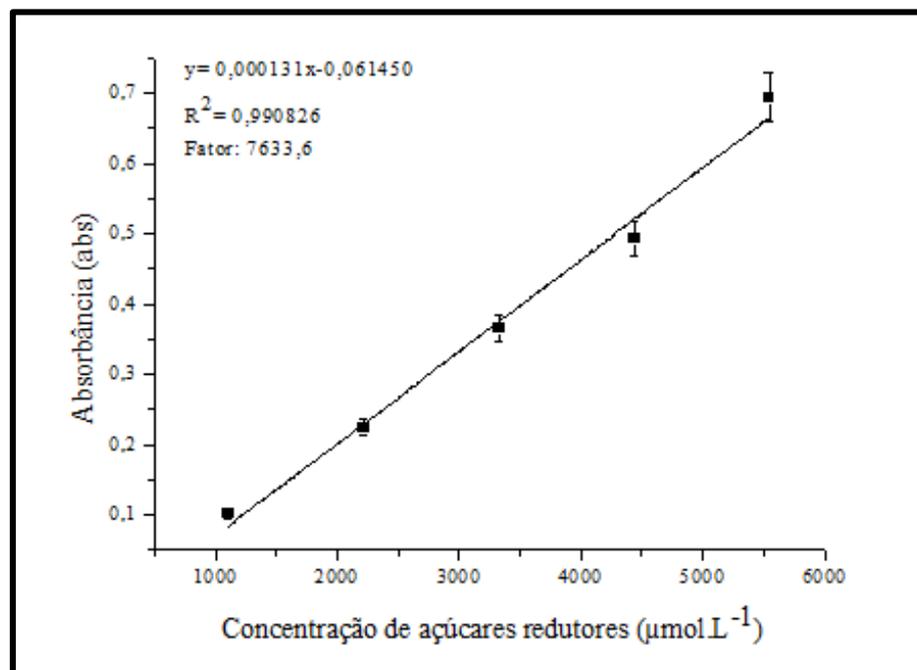


Figura 25 – Curva analítica do método DNS para a determinação de açúcares redutores

APÊNDICE B – Resultados das quantificações de proteínas totais por meio do método Dumas

Tabela 10 – Concentração de proteínas totais dos ensaios realizados na coluna de bolhas e espuma

Ensaio	Proteínas totais (%) (Caldo inicial)	Proteínas totais (%) (Caldo final)	Proteínas totais (%) (Espuma total)
1	0,1025	0,0550	0,0712
2	0,0531	0,0622	0,2417
3	0,000	0,2631	0,0961
4	0,3774	0,1299	0,3293
5	0,2883	0,0995	0,2295
6	0,0000	0,0783	0,0591
7	0,0000	0,0211	0,0130
8	0,0178	0,0864	0,0000
9	0,2265	0,2406	0,2444
10	0,1948	0,0990	0,2385