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

MODELAGEM CINÉTICA E SIMULAÇÃO DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR FRUTOSILTRANFERASE DE *Rhodotorula* sp. LIVRE E IMOBILIZADA

Autora: Mónica Beatriz Alvarado Huallanco

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

AL86m	Alvarado Huallanco, Mónica Beatriz Modelagem cinética e simulação de processo de produção de frutooligossacarídeos por frutosiltransferase de <i>Rhodotorula</i> sp. livre e imobilizada / Mónica Beatriz Alvarado Huallanco Campinas, SP: [s.n], 2010.
	Orientador: Francisco Maugeri Filho Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
	 Frutosiltransferase. Frutooligossacarídeos. Transfrutosilação. Imobilização. Modelagem matemática e simulação. Maugeri Filho, Francisco. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. Título.

Título em inglês: Kinetic modelling and process simulation of fructooligosaccharides production by free and immobilized fructosyltransferase of *Rhodotorula* sp. Palavras-chave em inglês (Keywords): Fructosyltransferase, Fructooligosaccharides Transfructosylating, Immobilization, Mathematical modelling and simulation Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho Fernando Antonio Cabral Aline Carvalho da Costa Marcio Antonio Mazutti Eloizio Julio Ribeiro Data da defesa: 10/12/2010 Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

COMISSÃO JULGADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Mônica Beatriz Alvarado Huallanco e aprovado pela Comissão Julgadora em 10 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho - Orientador

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – Membro

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa – Membro

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti - Membro

Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro – Membro

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho – Membro Suplente

Profa.Dra. Gabriela Alves Macedo – Membro Suplente

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala – Membro Suplente

iv

A meus pais Nora e Elard pelo carinho, exemplo de vida, dedicação, honestidade e porque me ensinaram a não desistir.

A meus irmãos Elard, Patrícia e Erick mesmo de longe me apoiaram e torciram por mim.

Ao Alexandre e Luaninha pelo amor, a compreensão e apoio, amo vocês.

vi

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Francisco por sua orientação, paciência e por acreditar em mim.

A banca examinadora por suas valiosas sugestões e correções que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

A Elizama e ao Geraldo pela ajuda nos meus experimentos, pela amizade, paciência e por me fazerem sentir como em casa.

A toda equipe do LEB: Raquel, Ana Paula, Rossana, Andréa, Barbara, Cris, Susan, Suzana, Daniela, Gislaine, Remi, Marcus, Abraão, Rafael pelo apoio e amizade e por todos os momentos de descontração.

A Fifa pela ajuda, dedicação e carinho transmitido.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos.

INDICE

RESUMO	xiii
ABSTRACT	

PARTE I1
1 INTRODUÇÃO GERAL
2 OBJETIVOS GERAIS
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL
3.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)
3.1.1 EFEITOS BENÉFICOS À SAÚDE
3.1.2 APLICAÇÃO DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS9
3.1.3 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS9
3.1.4 MECANISMO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS 12
3.1.5 FRUTOSILTRANSFERASE
3.1.5.1 ENZIMA IMOBILIZADA16
3.1.5.2 <i>Rhodotorula</i> sp
3.1.5.3 FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR DA Rhodotorula sp
4 MODELAGEM MATEMÁTICA21
4.1 FORMULAÇÃO DO MODELO
4.1.1 REATOR DE MISTURA
4.1.1.1 TRANSFERÊNCIA DE MASSA
4.1.1.2 TRANSFERÊNCIA DE MASSA EXTERNA
4.1.2 REATOR DE CESTO EM BATELADA
4.1.3 REATOR DE CESTO CONTÍNUO
4.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

4.2.1 CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN
4.2.2 CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO
4.2.3 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA
4.2.3.1 INIBIÇÃO COMPETITIVA
4.2.3.2 INIBIÇÃO NÃO COMPETITIVA
4.2.3.3 INIBIÇÃO INCOMPETITIVA
4.2.3.4 INIBIÇÃO MISTA
4.3 AJUSTE E VALIDAÇÃO DO MODELO
4.3.1 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE
4.4 SIMULAÇÃO
4.4.1 SIMULINK
4.4.2 SIMULINK PARAMETER ESTIMTION®42
4.4.3 ANÁLISE NUMÉRICA43
4.4.3.1 SOLVERS PARA PROBLEMAS NON-STIFF
4.4.3.2 SOLVERS PARA PROBLEMAS STIFF
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

PARTE II
ARTIGO 1: ESTUDO CINÉTICO E MODELAGEM PARA A PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE A PARTIR DA
Rhodotorula sp

ARTIGO 2: CINÉTICA E MODELAGEM DA SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA A PARTIR DE *Rhodotorula* sp..**85**

ARTIGO 3: MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA
OPERANDO EM REATOR DE CESTO EM BATELADA

ARTIGO 4: MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE REATOR DE CESTO	
CONTINUO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR	
FRUTOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA 1	145

CONCLUSÕES GERAIS	. 175
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	178

RESUMO

Os frutooligossacarídeos são considerados prebióticos, uma vez que promovem seletivamente o crescimento de micro-organismos probióticos como Lactobacillus acidophillus e Bifidobacterium bifidus. Novas enzimas, na forma livre ou imobilizada, representam uma das possibilidades para síntese destes compostos. Neste trabalho procedeu-se ao estudo da modelagem cinética e simulação da síntese de frutooligossacarídeos a partir de sacarose em diferentes tipos de reatores, pela enzima frutosiltransferase produzida pela levedura do gênero Rhodotorula, isolada em trabalhos prévios. Os estudos foram realizados sob condições de pH 4,5, 50°C e 5 U_{TF}/mL de concentração da enzima. Tanto a enzima livre quanto a imobilizada mostraram seguir a cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato para concentrações acima de 70% e 60% (p/v), respectivamente. Observou-se inibição competitiva da glicose para os substratos sacarose, kestose e nistose. Por outro lado, considerou-se significativa a atividade hidrolítica da nistose, sendo incluída no modelo. Após a análise de sensibilidade dos parâmetros cinéticos, estes foram ajustados por simulação, e determinou-se seus valores intrínsecos. O modelo mostrou-se válido com desvios menores que 4% para a enzima livre (57% de FOS) e de 5% para enzima imobilizada (46% de FOS), indicando que ele pode ser utilizado no desenvolvimento e controle de biorreatores. No caso da enzima imobilizada incluiu-se no balanço de massa o efeito da resistência à transferência de massa externa. Devido ao suporte ser um sólido compacto, com porosidade interna desprezível, desprezou-se a difusão intraparticular, considerando-se que a imobilização da enzima foi somente na superfície da partícula. A otimização do processo em reator de cesto em batelada, tanto quanto na do reator de cesto contínuo, foi realizada segundo delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR), nas condições de 50% de sacarose, 50°C e pH 4,5. As condições ótimas para o processo em batelada, foram de 14 U_i/mL para a enzima imobilizada e 45 rpm para a agitação, sendo o rendimento de FOS igual a 50,60% após 24 horas de síntese. Para o reator de cesto contínuo as variáveis otimizadas foram de 15 U_i/mL para a enzima imobilizada e 45 rpm para a agitação, com rendimentos de FOS de 32,1% e produtividade de 5,0 g/L.h, com tempo de residência de 32 h. Neste último caso, o componente principal de FOS foi o GF_4 (25%). Os resultados mostraram que a atividade biocatalítica e o coeficiente de transferência de massa tiveram influência significativa no curso da reação e no rendimento de produção de FOS e que o melhor processo foi o de batelada em reator de cesto.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are considered prebiotics, since selectively promote the growth of microorganisms as probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium bifidus acidophillus. New enzymes, in its free or immobilized form, represent one of the possibilities for this development. In this work, the kinetic modeling and simulation of the synthesis of FOS from sucrose in different types of reactors were carried out. The enzyme utilized was the fructosyltransferase from Rhodotorula sp., a microorganism isolated in a previous study. The studies were performed under conditions of pH 4.5, 50°C and 5 U_{FT}/mL concentration of enzyme. Both free and immobilized enzymes showed the Michaelis-Menten kinetics with substrate inhibition, at concentrations above 70% and 60% (w/v), respectively. Additionally, it was shown that there is competitive inhibition of glucose over sucrose, kestose and nystose uptake. Moreover, the hydrolytic activity on nystose was considered significant, therefore, it was included in the model. After the parameter sensitivity analysis the intrinsic kinetic parameters were determined and the model was validated against experimental data for sucrose concentrations of 50 and 70%. The model proved to be valid with deviations of less than 4% for the free enzyme (57% FOS) and 5% for immobilized enzyme (46% FOS), indicating that it can be used in the development and control of bioreactors. The enzyme immobilization was by adsoption on the surface of a niobium ore, which is a compact solid with negligible internal porosity. For the batch and continuous basket reactor processes, the optimization experiments were simulated in two central composite rotatable designs (DCCR), using 50% of sucrose concentration, 50°C and pH 4.5. The optimum conditions for the batch reactor were: 14 U/mL for the activity of immobilized enzyme and agitation speed of 45 rpm, with yield of 50.60% of FOS, after 24 hours of synthesis. For the continuous basket reactor, the optimum conditions were: an activity of immobilized enzyme of 15 U_i/mL and an agitation speed of 45 rpm, performing a FOS yield of approximately 32.1% and produtivity of 5.0 g/L.h, with a residence time of 32 h. In the latter case of the main FOS fraction was the GF₄, with about 25% of the total, a result very different from those obtained with other types of reactors. The results showed that the immobilized enzyme activity and the coefficient of mass transfer had a significant influence on the course of the reaction and the yield of FOS and that the best process for FOS production is the batch basket reactor.

PARTE I

1 Introdução geral

Nos últimos anos vem sendo observado o aumento da aplicação de tecnologias que priorizam o uso de micro-organismos ou enzimas, tecnologias estas que se convencionou chamar de Biotecnologia. Assim, processos como os de produção de xaropes de alto conteúdo de frutose, de polissacarídeos, como a goma xantana, inseticidas bacterianos, bioetanol, fármacos, entre outros, estão sendo intensificados. A biotecnologia é a utilização potencial de todas as formas de vida e de seus produtos, e os micro-organismos têm um importante papel no desenvolvimento desta tecnologia que será utilizada cada vez mais no futuro.

As enzimas, catalisadores de reações biológicas, cujas funções são exploradas num amplo setor industrial e particularmente na indústria de alimentos, possuem importante papel por permitirem a obtenção de numerosos produtos alimentícios. Na utilização de enzimas em alimentos, são levados em conta a sua seleção e controle de atividade, sendo inativada quando seu comportamento é indesejável, e favorecendo sua ação quando útil ao processamento do produto (EVANGELISTA, 1987).

Atualmente existe uma grande preocupação em todo o mundo com a qualidade de vida e saúde, aumentando o cuidado da população com os alimentos que são consumidos. Em resposta ao atrativo crescente dos consumidores por estes alimentos saudáveis (alimentos funcionais) e de calorias controladas, um grande número de adoçantes alternativos tem surgido desde 1980 e, entre eles, diversos oligossacarídeos. Destes oligossacarídeos podem-se destacar os frutooligossacarídeos (FOS), os quais são importantes, não só pelo baixo teor calórico e doçura, mas, principalmente, por suas propriedades funcionais (PASSOS & PARK, 2003). Os FOS são considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium bifidus*. Promovem uma série de benefícios à saúde, desde a redução do colesterol

sérico até o auxilio na prevenção de alguns tipos de câncer, assim como a prevenção de cáries dentárias (PASSOS & PARK, 2003; HIDAKA *et al.*, 1986).

Atribui-se a sua expansão no mercado de açúcar devido ao fato de que sua produção em massa não é complicada e seu sabor doce é muito similar ao da sacarose, o adoçante tradicional (YUN, 1996). As enzimas de fontes microbianas podem trazer um futuro bastante promissor devido ao rápido ciclo reprodutivo dos micro-organismos, conseguindo-se obter grandes populações de células que aumenta a produtividade. Graças à manipulação genética, podem ser selecionadas cepas de alta produtividade e especificidade. As operações envolvidas na extração da enzima são de maneira geral, simples e o controle de produção pode ser feito desde a fonte até a comercialização (VITOLO, 1981). O produto enzimático deve ser testado segundo a atividade enzimática e caracterizado segundo as condições ótimas como pH e temperatura, assim como a cinética de reação, estabelecendo-se critérios para o controle do processo e, portanto, podendo o reator mais adequado a nível industrial ser projetado.

No Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP desde 2002, vêm-se estudando a obtenção de FOS utilizando leveduras "não convencionais", isoladas no meio ambiente, utilizando-se meios sintéticos para a produção de frutosiltransferases. As enzimas obtidas mostraram-se altamente eficientes em atividade de transferência de frutose (UTF), com valores no caldo de fermentação de até 100 U_{TF} /mL e uma faixa de temperatura ótima de ação entre 60 e 66°C, segundo Hernalsteens (2006). Entre os organismos isolados, um pertencente ao gênero *Rhodothorula*, se mostrou particularmente interessante. No presente momento, a continuidade dos estudos visam a diminuição de custos de produção e neste sentido obteve-se uma produção de enzima de 50 U_{TF} /mL utilizando meios industriais. Em termos de rendimento de oligossacarídeos, em trabalhos anteriores (Patente n. 202602-3, 2002), o rendimento máximo era de ordem de 18%, enquanto que com a enzima

produzida por este micro-organismo chega a 60%. Além disso, a enzima é mais estável, o que aumenta o interesse econômico.

A enzima β -frutosiltransferase de outros micro-organismos é considerada na categoria GRAS, podendo ser utilizada livremente na industria de alimentos. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são inócuos para a produção de enzimas na obtenção de FOS, assim como é utilizado na obtenção de diferentes produtos para a indústria de alimentos: gorduras (ROSE & HARRISON, 1970), etanol, ácido acético e acetaldeido (YECH, 1996), epoxido hidrolase (KRONENBURG *et al.*, 1999), invertase (RUBIO *et al.*, 2002), carotenóides (BUZZINI *et al.*, 2005). Um dado importante é que, neste projeto, a enzima será purificada e imobilizada, de forma que o risco de existência de substâncias alergênicas ou tóxicas no produto final é praticamente nulo.

2 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a modelagem matemática da cinética de atuação da enzima frutosiltransferase de *Rhodotorula* sp. para a produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, e a partir deste modelo simular diferentes reatores de síntese do oligossacarídeo. Para isto as seguintes etapas foram cumpridas:

- Produzir, extrair e pré-purificar a enzima frutosiltransferase.
- Estudar a cinética da enzima na forma livre.
- Estudar a cinética da enzima na forma imobilizada em suporte inorgânico de nióbio.
- Propor um modelo matemático, simular e validá-lo a partir de dados experimentais para a enzima nas formas livre e imobilizada.
- Modelar, simular e otimizar a produção de FOS a partir da enzima frutosiltransferase imobilizada no suporte de nióbio utilizando o reator de mistura (RM), reator de cesto em batelada (RC), reator de cesto continuo (RCC).

3 Revisão bibliográfica geral

3.1 Frutooligossacarídeos (FOS)

Os FOS são oligossacarídeos de ocorrência natural, encontrados em produtos de origem vegetal (HARTEMINK *et al.*, 1997) e o consumo na indústria dos chamados açúcares não convencionais tem aumentado nos últimos anos, devido às suas excelentes características funcionais em alimentos, além de seu aspecto fisiológico e físico (SPIGEL *et al.*, 1994).

FOS é o nome dado para oligômeros de frutose que são compostos, mais comumente, de 1kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil nistose (GF_4), em que as unidades de frutosil (F) são ligadas na posição beta 2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996).

Os FOS apresentam ao redor de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, , são açúcares ou fonte de energia, e podem ser utilizados de forma segura por diabéticos. Apresentam solubilidade maior que a da sacarose, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sensação de secura ou areia na boca. Os FOS são degradados na maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados em frutose em condições muito ácidas ou em condições de exposição prolongada a determinadas combinações de tempo e temperatura (BORNET, 1994; YUN, 1996).

Os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares na maioria dos países, são fibras dietéticas, confirmado pelas autoridades legais de vários países e, nos Estados Unidos, possuem o status GRAS (*Generally recognized as safe*).

3.1.1 Efeitos benéficos à saúde

Os FOS são conhecidos como prebióticos, pois promovem o crescimento de probióticos, como *L. acidophillus, B. bifidus* e *E. Faecium*, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação de FOS na dieta intensifica a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal, mudando a composição de sua microbiota, e inibindo a ação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli, Clostridium perfringes* e outras (YAMASHITA *et al.*, 1984, SPIGEL *et al.*, 1994, GIBSON & ROBERFROID, 1995).

O consumo de FOS estimula outros efeitos benéficos à saúde, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácido gástrico, redução da absorção de carboidratos e lipídeo sérico e melhora o metabolismo em diabéticos (YAMASHITA *et al.*, 1984; SPIGEL *et al.*, 1994). Pode-se observar um aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno, aumento da síntese de vitaminas como as do grupo B, aumento da produção de compostos imuno estimulantes, com atividade antitumoral, diminuição do crescimento de bactérias nocivas, diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxilio da restauração de flora intestinal normal durante a terapia com antibióticos. Assim, produz a redução da potencialidade de várias patologias humanas normalmente associadas com o alto numero de bactérias patogênicas, como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarréia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerância a alimentos e gases intestinais (YUN, 1996).

Segundo estudos realizados por Bouhnik *et al.* (1996) demonstrou-se que a ingestão de FOS tem efeitos significativos na queda da contagem de anaeróbios totais nas fezes, queda do pH, diminuição da atividade de nitroredutases, azoredutases e beta glucoronidases, diminuição na concentração de bile ácida e esterol neutro, uma vez, que leva ao aumento da colonização de

bifidobacterias. Além disso, possuem características de prevenção de cáries dentárias, redução dos níveis séricos de colesterol total e lipídeos, assim como na atuação como estimulante do crescimento de bifidobacterias no trato digestivo (YAMASHITA *et al.*, 1984; HIDAKA *et al.*, 1986; MODLER, 1994). Os FOS não são digeridos pelo metabolismo humano (MOLIS *et al.*, 1996), mas são rapidamente fermentados pelas bacterias presentes no colón. (HARTEMINK *et al.*, 1997).

3.1.2 Aplicação dos frutooligossacarídeos

Os FOS podem ser utilizados em formulações de sorvetes e sobremesas lácteas que levam no rótulo "açúcar reduzido", "sem adição de açúcar", "calorias reduzidas", "produto sem açúcar", etc., em formulações para diabéticos, em produtos funcionais que promovam efeito nutricional adicional, fibras dietéticas, em iogurtes, em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar, em barras de cereais, sucos e néctares frescos, produtos de confeitaria, molhos, em alimentos simbióticos funcionais, quando adicionados conjuntamente com micro-organismos probióticos (YUN, 1996). Podem ser utilizados como aditivos alimentares para suínos e aves domésticas (FISHNEIN *et al.*, 1988).

3.1.3 Produção de frutooligossacarídeos

Os FOS podem ser obtidos do ponto de vista comercial de duas formas:

a) Preparados por hidrólise enzimática da inulina, que consiste em unidades lineares de frutosil com ou sem uma unidade final de glicose. O grau de polimerização desses FOS varia entre 1 e 7 unidades frutosil. Este produto é comercializado como "Raftilose", produzido pela Orafti Ltda, da Bélgica, ou como "Frutafit", produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda. Este processo ocorre amplamente na natureza, e esses oligossacarídeos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas (ROBERFROID, 1993), como alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo, tomate (YAMASHITA *et al.*, 1984; SPIGEL *et al.*, 1994 e YUN, 1996). Também podem ser encontrados no mel (STEYN, 1996), no açúcar mascavo, em tubérculos como o yacon (OHYAMA *et al.*, 1990; FUKAI *et al.*, 1993; GOTO *et al.*, 1995).

b) Preparados por reação enzimática de transfrutosilação em resíduos de sacarose, e consiste tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades frutosil. Este produto é produzido pela Meiji Seika Ltda (Tóquio, Japão), e comercializado como "Neosugar", "Profeed", "Meioligo", ou "Nutraflora".
O "Actilight" é produzido e comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (HIDAKA *et al.*, 1986; HARTEMINK *et al.*, 1997).

O processo de produção de FOS pode ser dividido em duas formas, a primeira mediante o uso de enzima na forma livre em reatores de batelada, e a segunda mediante a utilização de processos contínuos utilizando a enzima ou células imobilizadas. Muitos estudos têm sido realizados para otimização das condições de produção de FOS mediante a utilização de diferentes microorganismos. Assim, todos os estudos reportaram limitadas faixas de temperatura e pH ótimos. O valor típico de condições recomendadas para a produção de FOS foram valores de pH entre 5,0 e 5,5 e temperatura de 55 a 60°C (JUNG *et al.*, 1989; CHENG *et al.*, 1996; KURAKAKE *et al.*, 1996; CHIANG *et al.*, 1997). Sangeetha *et al.* (2004) obtiveram máxima produção de FOS após 8 horas de reação em meio reacional com 60% de sacarose utilizando a frutosiltransferase de *Aspegillus oryzae*. Por outro lado, segundo os estudos realizados por Van Balken *et al.* (1991), a enzima presente no micélio de *Aspergillus phoenicis* tem uma temperatura ótima de 60°C, mostrando uma termo-estabilidade relativamente alta, assim como um pH ótimo alcalino (7.5 a 9.0). Por outro lado, a invertase também presente no micélio do *Aspegillus phoenicis* tem um pH ótimo para 1-kestose e nistose, enquanto que a frutose é formada em pequena quantidade. Sob condições ótimas, 55 °C, pH 8,0 e concentração inicial de sacarose de 750 g/L obtiveram um rendimento de 300 g/L de 1-kestose, em 8 horas de reação.

Jung *et al.* (1989) investigaram a influência da temperatura sobre a atividade de frutosiltransferase na faixa de 40 a 70°C, obtendo uma curva de atividade da enzima completamente simétrica, com uma atividade máxima a 55°C. O efeito do pH foi verificado pela medição da quantidade de 1-kestose produzida em duas soluções tampão: tampão citrato (pH de 3,0 a 5,0) e tampão fosfato (pH de 6,0 a 8,0), devido a que a sacarose pode ser hidrolisada nestes valores. Os resultados mostraram a ativação da enzima em pH acima de 5,0, sendo o pH ótimo de 5,5.

Em estudos realizados por Hernalsteens e Maugeri (2006) foi atingido um rendimento de FOS entre 55 e 65%, sendo que as condições ótimas para a FTase de *Rhodotorula* sp. foram: 50°C, pH 5,0, para uma concentração de enzima de 6,5 U_{TF}/mL e 50% de sacarose. Sob estas condições o tempo de reação variou de 24 a 29 h. No entanto, a partir da utilização de açúcar comercial e melaço de cana de açúcar os rendimentos foram de 63 e 52%, respectivamente. Madlová *et al.* (1999) encontraram que o efeito de pH na faixa de 4 a 8 resulta ser significativo para a produção de FOS e o rendimento ao redor de 70% em todos os casos. Observaram que um aumento na temperatura produz um acrescimo na taxa inicial de reação, sendo que a tempeartura ótima encontra-se entre 60 e 65°C. Observaram que após 1 hora de reação o rendimento dos FOS alcança o valor máximo independentemente da temperatura.

Estudos realizados por Park *et al.* (1999), mostraram que um novo isolado de *Bacillus marcerans*, EG-7, requer um período de adaptação para que a atividade catalítica de formação de FOS a partir da sacarose inicie. O período de adaptação ao meio foi amplamente reduzido pela adição de íons amônia à mistura da reação e 100 mM de NH₄NO₃ intensificaram a atividade da enzima, reduzindo o tempo de adaptação do micro-organismo de 25 horas para 30 min.

Hidaka *et al.* (1988) investigaram a ação de FTases em sacarose e selecionaram o fungo *Aspergillus níger* como o mais apropriado para a produção de FOS. Esta espécie mostrou alta produtividade da FTase, e sua atividade de transfrutosilação foi comparada com sua atividade de hidrólise. Observaram que a enzima de *Aspergillus niger* tem uma alta atividade de transfrutosilação para concentrações de sacarose de 50% (p/v). As condições de otimização da reação de transfrutosilação foram estudadas por muitos autores. Recomenda-se que a concentração de sacarose no meio reacional deva estar entre 600 a 850 g/L, então a atividade de transferase pode ser dominante sobre a atividade hidrolítica (JUNG *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1996; KURAKAKE *et al.*, 1996; CHIANG *et al.*, 1997). Chien *et al*, (2001) imobilizaram o micélo de *Aspergillus japonicus* em glúten e obtiveram rendimento do 61% de FOS após 5 h, para um máximo de 40% de sacarose. Em menores concentrações de sacarose a atividade invertase compete com a de transfrutosilação e, conseqüentemente, há menor rendimento de FOS (20%), devido à liberação de maior quantidade de glicose e frutose. Porém, o maior rendimento foi obtido quando se utilizou 500 g/L de sacarose (KIM *et al.*, 2000).

Todos os estudos mostram que o produto da reação enzimática e sua composição foram similares, independentemente da fonte da enzima. Os xaropes comerciais de FOS contem 25 a 30% (p/v) de 1-kestose (GF₂), 10 a 15 % de nistose (GF₃), e 5 a 10 % de 1f-frutofuranosilnistose (GF₄), incluindo 25 a 30% de glicose livre como produto (YUN *et al.*, 1990; YUN *et al.*, 1992; HAYASHI *et al.*, 1991).

3.1.4 Mecanismo para a produção de frutooligossacarídeos

O mecanismo detalhado para a formação de FOS a partir da sacarose foi estudado por Jung *et al.* (1989) que indicaram que a formação de FOS ocorre mediante um conjunto de reações consecutivas, a saber:

$$GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$$

onde: n (inteiro) > 1, G e F é porção de glucopiranosil e frutofuranosil na molécula de sacarose, respectivamente.

Duan *et al.* (1994), baseados no estudo realizado por Jung *et al.* (1989), propuseram o estudo cinético para a atividade de uma frutosiltransferase. O mecanismo de reação catalisada pela enzima envolvida na produção de FOS é apresentado nas equações 1 a 4:

$$2 \operatorname{GF} \to \operatorname{GF}_2 + \operatorname{G} \tag{1}$$

$$2 \operatorname{GF}_2 \to \operatorname{GF}_3 + \operatorname{GF} \tag{2}$$

$$2 \operatorname{GF}_3 \to \operatorname{GF}_4 + \operatorname{GF}_2 \tag{3}$$

$$GF_3 \rightarrow GF_2 + F$$
 (4)

A inibição competitiva da glicose foi incluída nas equações (1 a 3), tendo sacarose (GF), 1kestose (GF₂) e nistose (GF₃) como substratos das reações catalisadas pela frutosiltransferase. A inibição dos substratos inclui-se na equação (1) para a reação de transfrutosilação de sacarose e equação (4) para a reação de hidrolise da nistose.

Os efeitos da concentração da sacarose, 1-kestose ou nistose sobre a atividade frutosiltransferase foram investigados para uma temperatura de 55°C e pH de 5,5. Os valores de K_m e $V_{máx}$ para cada substrato foram determinados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk. Como mostraram os autores, houve um aumento no número de unidades de frutose no meio, resultando em uma diminuição do valor de $V_{máx}$ e aumento do valor de K_m (JUNG *et al.*, 1989).

3.1.5 Frutosiltransferase

A frutosiltransferase é uma enzima conhecida como a catalisadora de transformações de

sacarose em FOS. Está enzima é produzida em laboratório na forma extra e intracelular por vários micro-organismos, incluindo *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus awamori, Aureobasidium sp., Aureobasidium pullulans, Aspergillus japonicus, Aspergillus phoenicus* e *Arthobacter sp.* (HIDAKA *et al.*, 1986).

Alguns pesquisadores utilizam a denominação β -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) com atividade de transfrutosilação, conforme citação de L'Hocine *et al.* (2000) ou β -frutosiltransferase (EC 2.4.1.9). Esta é uma das enzimas utilizadas na obtenção de FOS e pode ser de diversas origens microbiana e vegetal (GHAZI *et al.*, 2005), podendo hidrolisar tanto moléculas com ligação β -2-1 frutofuranosídicas (sacarose, inulina etc.), como sintetizar compostos contendo o mesmo tipo de ligação, como os FOS, dependendo das condições de reação.

A enzima frutosiltransferase tem sido purificada e caracterizada (HIRAYAMA *et al.*, 1989; SHIOMI, 1981). Em geral, a enzima produzida por micro-organismos é de maior peso molecular e mais estável que as originadas de plantas. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura indica que a atividade de transfrutosilação é favorecida em valores ótimos de pH entre 5 e 6,5 e temperaturas entre 50 e 60°C (HIRAYAMA *et al.*, 1989; SHIOMI, 1981 e YUN, 1996). A enzima é adequada para uso comercial desde que as reações desejáveis sejam favorecidas em altas concentrações de sacarose.

O mecanismo de ação desta enzima depende da fonte; se a fonte for vegetal ou produzida por alguns micro-organismos, sua ação ocorre em conjunto com uma série de outras enzimas. Mas para outros micro-organismos, sua ação é única, não necessitando de outras enzimas (YUN, 1996). Como uma enzima do grupo transferase, a reação conduzida por ela consiste na transferência de um grupo de uma molécula para outra, mais especificamente de grupos frutosil (DIXON & WEBB, 1979). A FTase de *Aspegillus oryzae* tem máxima atividade a 60 °C e pH de 6,0. A enzima mostrou boa estabilidade a 40°C e na faixa de pH de 5,0 a 7,0, de acordo com os estudos de Sangeetha *et al.* (2004). Já L'Hocine *et al.* (2000) encontraram que o pH e temperatura ótimos para a enzima frutosiltransferase de *Aspergillus niger* é de 5,8 e 50°C, respectivamente. A atividade catalítica foi dependente da concentração de sacarose, pois aumenta-se a atividade com o aumento da concentração da sacarose.

Para a enzima β -frutosiltransferase de *Aspergillus niger* foi constatado que em altas concentrações de sacarose, a transfrutosilação é favorecida e bastante eficiente. Porém em baixas concentrações de sacarose a ação hidrolítica era predominante (JUNG *et al.*, 1989). Os autores determinaram que a temperatura máxima de atividade para esta enzima foi 55 °C e seu pH ótimo foi de 5,5.

Por outro lado a frutosiltransferase de *Agave americana* foi ativada pelos íons Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Li⁺ e inibida por alguns minerais como Ag⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Al³⁺ e Sn²⁺ (BHATIA & NANDRA, 1979), enquanto que a enzima do *Aureobasidium* sp. foi inibida por íons Hg²⁺, Cu²⁺ e Pb²⁺ (HAYASHI *et al.*, 1991), porém estes ativadores não são estáveis.

De acordo com L'Hocine *et al.* (2000), alguns íons metálicos e outros inibidores têm diferentes efeitos sobre a atividade da enzima, sendo inibida por Hg^{2+} e Ag^{2+} . Assim, os estudos mostraram que o pH e temperatura ótimos para a enzima frutosiltransferase de *Aspergillus niger* foram 5,8 e 50°C, respectivamente. Os pesquisadores obtiveram valores de 44,38 mM para K_m e 1030 µmol/mL.min para V_{máx}, sendo que a atividade catalítica foi dependente da concentração de sacarose, pois há um aumento da atividade com o aumento da concentração da sacarose.

3.1.5.1 Enzima imobilizada

Alguns sistemas reacionais requerem que o biocatalisador esteja imobilizado em um material sólido, de forma que a concentração do mesmo tenha um aumento significativo, proporcionando, ao mesmo tempo, um contato ótimo com o substrato. Alguns micro-organismos e outros materiais celulares têm inclinação natural para aderir-se às superfícies e, portanto podem ser imobilizados (SCOTT, 1987).

A imobilização de enzimas é amplamente utilizada por apresentar algumas vantagens, como a fácil recuperação da enzima do sistema de reação e posterior reutilização; além disso, na maioria das vezes observa-se um aumento no tempo de vida útil, assim como boa tolerância a variações de forças iônicas, pH e temperatura. No entanto, devem-se fazer algumas considerações quanto às limitações difusionais e transferência de massa, que são fatores que afetam a atividade da enzima, visto que nutrientes e produtos têm que fazer o percurso através da camada limite externa (transferência de massa externa) para o interior da matriz (transferência de massa interna) (DE BACKER *et al.*, 1996; JOVETIC *et al.*, 2001; BAILEY, 1986).

Na literatura são descritos vários métodos de imobilização, sendo o encapsulamento um processo comum. Vários polímeros são utilizados, como poliacrilamida, gelatina, alginato e k-carragena (CHIBATA & TOSA, 1980; SHIN *et al.*, 2004).

A β -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus* é uma glicoproteína localizada na parede da célula, e sua maior atividade está relacionada com o micélio. O micélio foi imobilizado em alginato de cálcio, resultando numa imobilização rápida, sendo obtido uma boa resistência mecânica e grande aumento na estabilidade da enzima (CHENG *et al.*, 1996; CRUZ *et al.*, 1998). Estudos realizados por HAYASHI *et al.* (1994) utilizaram o alginato de cálcio para imobilizar a enzima de *Aureobasidium* sp. e obtiveram uma vida útil de 275 dias para um reator de leito fixo.

A frutosiltransferase de diferentes fontes já foi imobilizada em resinas de troca iônica numa solução contendo um agente bifuncional de ligação (KIM, 1993); por troca iônica (YUN, 1995); em suporte de polimetacrilato a partir de *A. aculeatus* (GHAZI *et al.*, 2005, TANRISEVEN, 2005); por adsorção em DEAE-celulose, para imobilizar a β-frutofuranosidase de *A oryzae* (KIDA *et al.*, 1988); por encapsulamento (HAYASHI *et al.*, 1994) e ligação covalente (PATIL, 1999). Chiang *et al.* (1997) imobilizaram a β-frutofuranosidase de *A. niger* por ligação covalente em metacrilamida baseada em bolhas poliméricas. A enzima de *A. aculeatus* foi imobilizado em pectinex ultra SP-L por ligação covalente (TANRISEVEN & ASLAM, 2005). A cepa de *A. aculeatus* foi imobilizado em batelada (GHAZI *et al.*, 2005). PLATOVA *et al.* (2006) imobilizaram a enzima de *Aureobasidium pullulans* em polimetacrilato, por ligação covalente em copolímero de butil acrilato e etileno glicol dimetacrilato (ONDERKOVA, 2007).

Para as frutosiltransferases, observou-se que a imobilização é extremamente benéfica, pois há um aumento da estabilidade da enzima, aliado ao fato de poder utilizá-las em reatores contínuos, que operam ininterruptamente durante 5 a 6 meses. Isto representa uma economia no processo, reduzindo custos de produção e melhorando a qualidade do produto. A frutosiltransferase imobilizada é muito importante para redução de custo na produção em grande escala. Em geral, a enzima imobilizada comparada com a enzima livre tem melhor estabilidade térmica, são fáceis de separar e podem ser reutilizadas ou usadas continuamente. Entre muitos processos de imobilização destacam-se as ligações covalentes. A eficiência da imobilização depende das propriedades do suporte, natureza da enzima e condições de imobilização. A eficiência da imobilização é caracterizada por sua atividade e estabilidade de armazenamento. Um dos parâmetros que influenciam esta eficiência é o pH do tampão utilizado (KIM, 1993; MARTIN, 2003; HERNAIZ, 2000).

17

Estudos específicos foram realizados com a FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. imobilizada em alginato por Hernalsteens (2006) e Aguiar-Oliveira (2007), indicando que o alginato não permite reuso, apresenta baixa estabilidade físico-química e não proporciona boa estabilidade para a enzima. De acordo com os estudos realizados por Aguiar-Oliveira e Maugeri (2010), os melhores resultados foram obtidos ao se imobilizar a enzima por adsorção em suporte sólido ácido inorgânico, composto por nióbio e grafite, obtendo-se uma eficiência de imobilização de 97,76 % para uma razão de 164 U_i/g suporte. Na síntese de FOS tendo sacarose a 50 % como substrato inicial, foi observado um rendimento em torno de 60 % não muito diferente aos da enzima livre.

As interações bio-específicas envolvem o reconhecimento da molécula alvo pelo sítio de adsorção e o ajuste dessa molécula à posição mais adequada através de interações entre o suporte e os resíduos de aminoácidos das proteínas. A complementaridade da interação é por meio da estrutura enzima-suporte, que permite a ligação da molécula ao suporte por ligações covalentes e/ou não covalentes. A conformação espacial da enzima em relação ao suporte ou sítio de adsorção tem papel fundamental na intensidade das interações bio-específicas. Vale lembrar que enzima e suporte não são estruturas naturalmente complementares e imediatamente após os primeiros pontos de ligação se formarem, a enzima perde flexibilidade (MATEO *et al.*, 2006; NOGUEIRA, 1999).

O pH do macro e micro-ambiente tem influência direta sobre a enzima e sua reatividade, estabilidade estrutural e solubilidade. A carga do suporte pode alterar o pH do micro-ambiente, alterando o perfil de pH da enzima após imobilização e pode ocorrer também alterações conformacionais da enzima, devido a protonação induzida por extremos de pH. Muitas vezes o pH ótimo da enzima não corresponde ao ótimo para um processo biotecnológico devido, muitas vezes à variação de solubilidade do substrato e produto, à mudança da posição de equilíbrio da reação, à ionização do produto, à reações adversas, ao ataque microbiano, etc. (RESHMI *et al.*, 2007; ARROYO, 1998; CHAPLIN, 1990; TREVAN, 1980).

Algumas das técnicas de imobilização enzimática para a FTase de *Rhodotorula* foram avaliadas por Aguiar-Oliveira (2007) e dentre elas se destacam a adsorção e a imobilização por ligações covalentes em suportes inorgânicos. Estudos realizados com a enzima FTase imobilizada em um suporte sólido ácido inorgânico composto por nióbio e grafite com grau de pureza em torno de 80% e com granulometria entre 65 e 80 mesh fornecido pela CBMM (Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração). Os estudos mostraram um deslocamento para uma faixa mais básica de pH em seu perfil após imobilização. Além do pH ótimo (4,5) para a enzima livre, observou-se ótima atividade e estabilidade em pH 6,0. Este comportamento pode ser explicado pela carga negativa do suporte.

Algumas enzimas necessitam de certos sais para realizar determinadas catálises. De acordo com Chaplin (1990), alguns sais necessários para boa reatividade de enzimas podem ser ligados ao suporte onde a enzima será imobilizada ou adicionados ao meio de reação. Resultados obtidos por Hernalsteens (2006) e Aguiar-Oliveira (2007), revelaram que a adição de alguns sais, especialmente o CuSO₄, apresenta efeito promotor da atividade e estabilidade para FTase extracelular de *Rhodotorula* sp. nas formas livre e imobilizada. Resultados semelhantes com este mesmo sal foram observados em trabalho de Papinutti *et al.*, (2008) com a enzima lactase.

Aguiar-Oliveira (2007) observou um deslocamento do perfil de atividade enzimática para uma região mais básica, quando comparada com a enzima livre, indicando efeito causado pela carga negativa do suporte. A adição de sais a 10 mM no meio de incubação demonstrou aumentar a estabilidade térmica do imobilizado, especialmente para o sal CuSO₄. Em pH 4,5 e 6,0 foram observadas altas atividades enzimáticas e estabilidade, em diferentes temperaturas, e ambos os valores de pH foram selecionados para caracterização do sistema. As meias-vidas da enzima imobilizada a 50°C em pH 4,5 e 6,0 foram respectivamente de 24 e 48 dias e a temperatura ótima para cada pH foi de 61 e 63°C. A cinética enzimática apresentou inibição pelo substrato sacarose, efeito não observado com a enzima livre (AGUIAR-OLIVEIRA, 2007).

3.1.5.2 Rhodotorula sp.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* podem apresentar coloração rosa, vermelha ou amarela e são responsáveis por colorações anormais de alguns alimentos e alteração de açúcar líquido e azeitonas. São produtoras de carotenóides de coloração vermelha ou amarela e são comuns em bebidas não alcoólicas (sucos de maçã, laranja, etc.) sendo a *R. glutinis* muito utilizada na produção de lipídios de origem microbiana. São consideradas "leveduras falsas" ou fungos imperfeitos, pois não produzem esporos sexuais (FRANCO & LANDGRAF, 2003; FRAZIER & WESTHOFF, 1978).

3.1.5.3 Frutosiltransferase extracelular da Rhodotorula sp.

De acordo com os estudos realizados por Hernalsteens (2006) no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA/FEA-UNICAMP) utilizando a enzima extracelular de *Rhodotorula* sp. na forma livre, após a purificação o peso molecular foi estimado em 170 kDa utilizando o gel de filtração e 77 kDa pela eletroforese desnaturante, SDS-PAGE. A determinação da massa molecular indica que a enzima na sua forma nativa se apresenta como um dímero. A enzima mostra ambas atividades, a frutofuranosidase/hidrolíitica (FA) e a frutosiltransferase (FTase). Utilizando a sacarose como substrato, observou-se uma cinética enzimática de transfrutosilação obedecendo à equação de Hill (Eq. 5) com valores para V_{max} de 236,1 µmol/mL, K_{0,5} de 299 g/L e h de 2,2. A maior atividade foi obtida para um pH de 4,0 e uma temperatura de 65 °C. Porém, observou-se uma estabilidade maior para pH de 5,0 e temperaturas inferiores a 60 °C.
$$v = v'_{\max} \frac{S^{h}}{K_{0,5}^{h} + S^{h}}$$

onde:

v = velocidade de reação

v'_{max} = velocidade limitante de reação

h = coeficiente de Hill (índice de cooperatividade)

 $K_{0,5}$ = concentração de substrato para v = 0,5 v'_{max}

O pH e temperatura ótimos para a atividade de frutofuranosidase se situaram em torno de 4,0 e 72 a 75°C, respectivamente, enquanto a frutosiltransferase mostrou atividade ótima em pH 4,5 e temperatura na faixa de 65 - 70°C. Ambas as atividades foram muito estáveis em temperaturas abaixo de 66°C, enquanto que para a atividade frutofuranosidase a enzima foi mais estável em pH 4,0 e para a frutosiltransferase em pH 5,0 (HERNALSTEENS, 2006).

4 Modelagem matemática

A modelagem matemática permite organizar informações desconexas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente, pensar logicamente a respeito de quais componentes e interações são importantes no sistema, descobrir novas estratégias para explicar o comportamento do sistema submetido a determinadas condições, corrigir falhas eventuais existentes no entendimento convencional de determinados fenômenos, e finalmente entender as características qualitativamente essenciais de determinado processo (BAILEY, 1998; INGHAM *et al.*, 2007).

O objetivo principal da modelagem e simulação é prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando a

(5)

determinação de condições operacionais economicamente ótimas do sistema, avaliando o projeto e o ajuste de algoritmos de controle, no qual o modelo matemático formulado passa a ser parte integrante do mesmo (BONOMI & SCHMIDELL, 2001; INGHAM *et al.*, 2007).

Uma etapa essencial no desenvolvimento de qualquer modelo é a formulação das equações de balanço de massa e energia, podendo-se incluir relações adicionais que representem: as taxas de reação química, as taxas de transferência de calor e massa e alterações de propriedades do sistema. A combinação destas relações constitui a base para a descrição quantitativa do processo e compreende o modelo matemático básico. O modelo resultante pode variar de um simples caso de equações até modelos de grande complexidade. Uma das habilidades da modelagem é, portanto, obter o modelo mais simples possível que seja capaz de uma representação realista do processo (INGHAM *et al.*, 2007).

4.1 Formulação do modelo

As equações de balanço de massa no estado estacionário baseiam-se no principio da conservação de massa. Para o estado estacionário (*steady-state*) o fluxo do processo é expresso por:

Taxa de massa na entrada do sistema = Taxa de massa na saída do sistema

O balanço de massa total dinâmico é dado por situações reais, no entanto, as condições são alteradas com relação ao tempo. Sob estas circunstâncias, o balanço de massa no estado estacionário é inapropriado e deve ser substituído por um balanço dinâmico ou balanço de massa no estado de equilíbrio, apresentado na Equação 6.

$$\begin{bmatrix} Taxa \ de \ acumulo \ de \ massa \\ no \ sistema \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} taxa \ mássica \\ na \ entrada \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} taxa \ mássica \\ na \ saída \end{bmatrix}$$
(6)

Neste caso a taxa de acúmulo representa a taxa de variação na massa total do sistema, com respeito ao tempo, e no estado estacionário essa taxa é igual a zero. Assim, o balanço de massa em estado estacionário é visto como uma simplificação do balanço de massa dinâmico geral. A escolha da região de balanço depende da área particular de interesse do modelo, a avaliação pode ser no reator ou numa região determinada do reator.

4.1.1 Reator de mistura

O reator de mistura, operando na forma de batelada, é um dos mais utilizados em processos enzimáticos, principalmente na área de alimentos. Neste tipo de reator se tem um ingresso inicial do substrato junto à enzima e logo é permitida que a reação ocorra sob condições ótimas (Figura 1). No entanto, este sistema pode levar a baixas produtividades, já que o substrato é adicionado de uma só vez no inicio da reação, podendo exercer efeitos de inibição. Além disso, apresenta tempo morto, como na carga e descarga do reator. O balanço de massa é dado pela Equação 7, se consideramos que a densidade é constante no reator, temos a equação simplificada (Eq. 8). Sendo que C_i é a concentração de substrato e V é o volume.



Figura 1. Esquema de operação de um reator de mistura.

$$\frac{dC_i V}{dt} = V.r(C_i, C_j)$$
Então se $\frac{d\rho V}{dt} = 0$, temos:
(7)

$$\frac{dC_i}{dt} = r(C_i, C_j)$$

Onde:

C_i : concentração do componente i

C_j : concentração de outra espécie que influencie a taxa de consumo ou formação de i na reação

V : volume do reator

r : taxa volumétrica de formação ou consumo do componente i.

Neste tipo de reatores a produtividade, Pr, dado em g/L.h é calculado pela equação 9, onde C é a concentração do produto, t é o tempo de reação.

(8)

$$\Pr = \frac{C}{t} \tag{9}$$

Quando uma enzima é imobilizada, a imobilização limita a mobilidade da mesma, podendo, portanto, ocorrer perda de acessibilidade desta ao substrato, levando a uma redução na atividade do catalisador (enzima), promovida por restrições difusionais, ou seja, dificuldade para acessar livremente ao sitio ativo. Isto é devido à presença de uma superfície rígida da partícula do suporte, o que pode fazer com que o produto se acumule nas proximidades do sítio ativo. As propriedades cinéticas da enzima são alteradas com o processo de imobilização devido às modificações conformacionais que a molécula da enzima sofre, afetando especialmente seu sitio ativo. Porém, a sua expressão depende da velocidade com que o substrato, atinge o sítio ativo no interior da partícula do catalisador. Nesse trajeto são gerados gradientes de concentração do substrato, cuja intensidade depende dos mecanismos de transferência. No exterior da partícula o processo de transferência pode ser por difusão molecular se a solução não estiver sendo agitada, ou convectivo, se houver agitação; ao atingir a superfície da partícula o substrato terá que fazer um percurso no interior que poderá ocorrer também por mecanismos difusionais ou convectivos, dependendo da natureza e estrutura do suporte inerte. Em geral a escolha do suporte, do meio e dos parâmetros de operação reduzem este efeitos (DUTTA, 2008; BLANCH, 1997; BON *et al.*, 2008).

A cinética enzimática, após a imobilização, pode também ser modificada, devido à interferência do suporte ou das ligações formadas entre a enzima e o suporte. O aumento de K_m significa que uma concentração maior de substrato é necessária para uma mesma taxa de reação observada com a enzima livre (CHAPLIN, 1990; WOODWARD, 1985). Assim, estudos realizados por Aguiar-Oliveira (2007) mostraram que, para a FTase de *Rhodotorula* sp. houve aumento do K_m de 299 g/L na forma livre para cerca de 370 g/L em pH 4,5, para uma concentração de sacarose de 500 g/L em pH 6,0 para a enzima imobilizada.

4.1.1.1 Transferência de massa

A imobilização de enzima pode introduzir um novo problema, o qual está ausente na enzima livre, ou seja, a resistência à transferência de massa devido, por um lado à existência da camada limite, e por outro lado devido a problemas difusivos se a enzima for imobilizada em poros ou no interior de uma matriz polimérica. Então a imobilização de enzimas gera fenômenos de resitência à transferência de massa, os quais são importantes fatores limitantes do processo, podendo assim afetar a velocidade global de reação. Se considerarmos estes fenômenos e seguirmos um caminho hipotético do substrato desde o liquido até o sitio de reação da enzima imobilizada, como se mostra na Figura 2, este caminho pode ser dividido nas seguintes etapas: (1) transferência do substrato do meio líquido para a camada limite de líquido ao redor da partícula com a enzima imobilizada e (2) difusão relativa através da camada limite (transferência de massa externa); e (3) difusão no interior da partícula até o sitio ativo da enzima no interior do suporte inerte (transferência de massa interna).



Figura 2. Diagrama esquemático da trajetória do substrato para o sitio de reação na enzima imobilizada.

Se a enzima é imobilizada na superfície da partícula insolúvel, então o caminho é composto apenas pela etapa (1) e (2), ou seja, uma resistência de transferência de massa externa, onde a taxa de transferência de massa é proporcional ao gradiente de concentração do substrato.

4.1.1.2 Transferência de massa externa

Em suportes não porosos a enzima está imobilizada à superfície e o substrato e o produto estão sujeitos apenas a resistências externas à transferência de massa através do filme de fluido ao redor da partícula. O fluxo de massa (J) pode ser expresso em função de um coeficiente de transferência de massa e de uma diferença de concentrações segundo a equação 10. (DUTTA, 2008; BLANCH, 1997).

$$J = K_L (C - C_s) \tag{10}$$

O coeficiente de transferência de massa K_L freqüentemente poder ser determinado por correlações empíricas que incluem propriedades físicas do fluido. Durante a reação enzimática de uma enzima imobilizada, assumindo o estado estacionário, a taxa de transferência do substrato é igual ao consumo do substrato. Portanto, se a reação da enzima é descrita pela equação de Michaelis Menten, o fluxo de massa pode ser descrito pela equação 11.

$$J = K_L(C - C_s) = \frac{v_{\text{max}}S}{K_m + S}$$
(11)

As equações 12 e 13, que expressam a relação das velocidades máxima de reação e máxima de transferência, conhecidas como número de Damkölher (Da), dão uma idéia de qual é a etapa limitante do processo (DUTTA, 2008; BLANCH, 1997).

$$Da = \frac{Taxa \ máxima \ de \ reação}{Taxa \ máxima \ de \ difusão}$$
(12)

$$Da = \frac{V_{\text{max}}}{K_L K_m} \tag{13}$$

Dependendo da magnitude de Da, a equação (11) pode ser simplificada. Se Da << 1, a taxa de transferência de massa é muito maior que a taxa de reação, então a reação global é controlada pela cinética de reação da enzima (reação limitada), segundo a equação 14.

$$v = \frac{V_{\max}S}{K_m + S} \tag{14}$$

Se Da >> 1, a taxa de reação é muito maior que a taxa de transferência de massa e a reação global é controlada pela taxa de transferência de massa, o que torna a equação 16 na equação simplifica de primeira ordem (Eq. 15).

$$v = K_L a C \tag{15}$$

Para avaliar a redução da velocidade devido à resistência de transferência de massa, define-se o fator de efetividade de uma enzima imobilizada, η , que traduz a razão entre a velocidade observada real e a velocidade que se observaria na ausência desses efeitos de acordo com a equação 16.

$$\eta = \frac{Taxa \ de \ reação \ observada}{Taxa \ calculada \ segundo \ a \ concentração \ de \ substrato \ no \ meio}$$
(16)

O fator de efetividade externo (η) é uma medida numérica da influência da resistência à transferência de massa observada na taxa de reação. Se $\eta \ll 1$, a resistência à transferência de massa é limitante do fornecimento do substrato à enzima, limitando assim a atividade catalítica da

enzima imobilizada. Se $\eta \cong 1$, a concentração do substrato na superfície do biocatalisador imobilizado é essencialmente a mesma daquela contido no meio, e a taxa de reação praticamente não é limitada pela transferência de massa.

Para a determinação do coeficiente de transferência de massa em reatores de batelada, com partículas em suspensão, utiliza-se a correlação de Levins & Glastonbury (1972) (Eq. 17) que relaciona os números adimensionais Sherwood (Sh), Schmidt (Sc)(Eq. 18) e Reynolds (Re) (Eq. 19). A determinação do coeficiente de difusão em líquidos é obtida pela equação de Stoke-Einstein (equação 21).

$$Sh = \frac{K_L d_p}{D(s)} = 2 + 0.47 \left[\frac{d_p^{4/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{\nu} \right]^{0.62} \left[\frac{D}{T_i} \right]^{0.17} \left[\frac{\nu}{D(s)} \right]^{0.36}$$
(17)

$$Sc = \frac{V}{D(s)} \tag{18}$$

$$\operatorname{Re} = \frac{\rho . N . D^2}{\nu} \tag{19}$$

$$v = \frac{\mu}{\rho} \tag{20}$$

$$D(s) = \frac{K_B T}{6\pi . \mu . R_o}$$
(21)

Onde:

D_p: diâmetro da matriz esférica

D(s): coeficiente de difusividade do soluto em solvente

v: viscosidade cinemática

N: freqüência de agitação.

K_B: constante de Boltzmann

T : temperatura absoluta

 μ : viscosidade do solvente

R_o: raio do soluto

Em tanques agitados costuma-se relacionar o numero de Reynolds (Re) com o consumo de potência por unidade de massa (ϵ), que é obtida pela equação 22. O numero de potência é obtido pela correlação de Rushton *et al.* (1950), conforme a equação 23.

$$\varepsilon = \frac{N_p \cdot N^3 \cdot D^5}{V_r}$$
(22)

$$Np = \frac{P}{\rho_L N^3 D^5}$$
(23)

Onde:

D : diâmetro das pás do agitador

N : freqüência de agitação

Np: número de potência

P: potência consumida

V_r: volume do líquido do reator

4.1.2 Reator de cesto em batelada

O reator de cesto fornece uma boa mistura e é fácil de ser mantido sob condições isotérmicas. A grande utilização destes reatores é na determinação das constantes cinéticas intrínsecas. Eles também são ideais para o estudo da influência da difusão intraparticular, na ausência de efeitos de transferência externa de massa. Este tipo de reator tem a vantagem que o biocatalisador não sofre atrito pelo agitador, sendo que o catalisador encontra-se contido em uma estrutura semi-permeável, à forma de uma cesta. Em alguns casos o biocatalisador é fixado em uma cesta estática anular em torno do impulsor (GOTO & SAITO, 1984) ou em um cesto rotativo movido pelo eixo (GOTO & SAITO, 1984; TESHIMA & OHASHI, 1977).



Figura 3. Esquema de operação de um reator de mistura perfeita. A cesta contendo a enzima é representada pela estrutura fixada em b, C_i é a concentração de substrato e V_R é o volume do reator.

Para reatores de cesto o balaço de massa segue o balanço utilizado no reator de batelada, no entanto a enzima encontra-se retida em um cesto, mudando assim as condições de transferência de massa. A determinação do coeficiente de transferência de massa (K_L) resulta ser diferente, podendo ser determinado utilizando a correlação de acordo com Teshima & Ohashi (1977) (Eq. 24) que relaciona o número de Sherwood (Sh) à taxa de energia de dissipação (ϵ), ao número de Scmidt (Sc) (Eq. 26) e às relações geométricas do reator. Um dos parâmetros nesta equação é a energia dissipada (ϵ), determinada a partir da equação 25.

$$Sh = \frac{K_L d_p}{D(s)} = 2 + 0.012 \left[\frac{\varepsilon d_p^4}{v^3} \right]^{0.41} \left[\frac{v}{D(s)} \right]^{0.64}$$
(24)

$$\varepsilon = \frac{P}{V \cdot \rho}$$

$$Sc = \frac{V}{D(s)}$$

Onde:

K_L: coeficiente de transferência de massa

d_p: diâmetro da partícula

ε: energia dissipada

v: viscosidade cinemática

D(s): difusividade do substrato em solução (Eq. 24).

P: potencia consumida

V: volume do reator

4.1.3 Reator de cesto contínuo

A maioria dos processos que envolvem a enzima imobilizada é operada continuamente. Eles podem ser divididos em dois tipos: reator contínuo com agitação e reator tubular.

No reator de cesto a enzima encontra-se retida no cesto do reator. O reator é continuamente alimentado com um fluxo volumétrico, Q, contendo substrato em concentração inicial, C_i, obtendo-se uma corrente continua do produto, P, como é mostrado na Figura 4.

(25)

(26)



Figura 4. Esquema de operação de um reator de cesto continuo. C_i é a concentração de substrato na alimentação, Q é o fluxo de alimentação e V_R é o volume do reator.

O balanço de massa de substrato, no estado estacionário para o reator de cesto continuo é dado pela equação 27 onde o tempo de residência (τ) é calculado pela equação 28.

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{C_{i0} - C_i}{\tau} - r_c C_i \tag{27}$$

$$\tau = \frac{V}{Q} \tag{28}$$

Onde:

C_i: concentração do substrato

- Cio: concentração de substrato na alimentação
- rc: taxa volumetrica de formação ou consumo do componente i

τ : tempo de residência

Para a determinação da produtividade (Pr) em processo continuo utiliza-se a equação 29 e a taxa de diluição é calculada a partir da equação 30.

$$\Pr = C \cdot D \tag{29}$$

$$D = \frac{Q}{V} \tag{30}$$

Sendo:

C: concentração do produto

D: taxa de diluição

4.2 Cinética enzimática

O estudo da cinética de reações enzimáticas visa medir as velocidades das transformações que se processam, estudando a influência de condições de trabalho como concentrações de reagentes, enzimas, temperatura, pH, concentração de ativadores e de inibidores. Correlaciona as equações empíricas ou modelos matemáticos relativos às velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam com o objetivo de colaborar na otimização do processo, desta forma estabelecer critérios para o controle do processo e posteriormente projetar o reator mais adequado (DIXON &WEBB, 1979).

4.2.1 Cinética de Michaelis-Menten

O modelo cinético para uma reação enzimática simples foi desenvolvida por Michaelis e Menten, o qual considera a velocidade inicial de reação quando a concentração do substrato é constante e a concentração do produto desprezível, e considerando também a existência de um complexo Enzima-Substrato (ES). A dependência da velocidade inicial de reação (v) em função da concentração de substrato (S) é apresentada na equação 31, sendo K_m a constante de saturação e V_{max} a velocidade máxima de reação (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$
(31)

Para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} uma das técnicas é utilizada a técnica de linearização da equação como descrita por Lineweaver-Burk, Eadie-Hanes e Hofstee. No entanto nem todas as reações enzimáticas seguem a teoria clássica descrita por Michaelis-Menten devido a problemas de inibições, seja por algum composto presente na solução, seja pelo próprio substrato ou pelo produto formado. Freqüentemente são realizadas correções nas equações cinéticas (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).

4.2.2 Concentração do substrato

A concentração do substrato influencia fortemente a atividade enzimática. Assim para baixas concentrações de substrato há uma relação direta entre o aumento da concentração do substrato e a velocidade de reação (cinética de primeira ordem). Para baixas concentrações, cada vez que duplica-se S, duplica-se o valor da velocidade (cinética de primeira ordem). No entanto para maiores concentrações de substrato, o aumento da velocidade passa a ser cada vez menor e, a partir de determinada concentração, a velocidade se estabiliza, mesmo que a concentração do substrato continue a aumentar (cinética de ordem zero) em que a velocidade é independente do S. Isto é devido ao centro ativo da enzima encontrar-se ligado à molécula do substrato, produzindo assim uma saturação dos centros ativos das enzimas. Pelo que, a partir deste momento, a quantidade de

produto formado por unidade de tempo (velocidade da reação) é constante, e a única possibilidade neste caso de aumentar a velocidade da reação é aumentar a concentração da enzima, sendo representado pela equação 32, onde K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m + S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{IS}}\right)}$$
(32)

4.2.3 Inibição da atividade enzimática

A presença de uma substância inibidora na solução provoca a diminuição da velocidade de reação, e sua ação pode ser reversível ou irreversível. Na inibição irreversível o inibidor reage quimicamente com a enzima levando a uma inativação praticamente definitiva. A inibição reversível é caracterizada por um equilíbrio estabelecido muito rapidamente entre a enzima e o inibidor. A inibição reversível pode ser competitiva, não competitiva, incompetitiva e mista, sendo avaliada pela constante de inibição (K_1).

4.2.3.1 Inibição competitiva

Um inibidor competitivo é uma molécula que compete diretamente com o substrato pelo centro de ligação à enzima. O inibidor geralmente tem semelhanças estruturais com o substrato para se ligar ao centro ativo, mas é suficientemente diferente para não reagir. Neste caso, quanto maior a concentração do inibidor (I), mais elevado o valor de K_m , e o V_{max} não sofre variação. Este tipo de inibição é representado pela equação 33 (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986), onde K_I é a constante de inibição.

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S}$$
(33)

4.2.3.2 Inibição não competitiva

Este tipo de inibição não é superado pelo aumento da concentração de substrato como na inibição competitiva. A molécula é ligada à enzima em um local diferente ao sitio ativo, alterando a conformação da proteína enzimática, o que a torna inativa. O valor de V_{max} diminui devido à ligação do substrato à enzima, e tem um efeito idêntico à diminuição da concentração total da enzima. O K_m é mantido constante já que a ação deste inibidor não afeta a ligação do substrato. Representa-se mediante a equação 34 (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = V_{\max} \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$
(34)

4.2.3.3 Inibição incompetitiva

A equação 35 represente este tipo de inibição, a qual é caracterizada pelo fato de que o inibidor se liga exclusivamente ao complexo ES e não à enzima livre. Como conseqüência, a inibição aumenta na medida em que aumenta a concentração do substrato. Os valores de $K_m e V_{max}$ são afetados e diminuem com o aumento da concentração do inibidor (DIXON &WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = \frac{\frac{V_{\text{max}}}{1 + I/K_I} \cdot S}{\frac{K_m}{1 + I/K_I} + S}$$
(35)

4.2.3.4 Inibição mista

O inibidor liga-se a um local especifico da enzima, que não é o centro ativo. Liga-se tanto à enzima livre como ao complexo ES. O V_{max} diminui e o K_m pode aumentar, diminuir ou manter-se. A representação da inibição mista é dada pela equação 36 (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986). Onde K_I é a constante de inibição e K_I' é a constante de inibição do complexo enzima-susbtrato inibidor.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot K_m + \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot S}$$
(36)

4.3 Ajuste e validação do modelo

O modelo matemático é representado por equações diferenciais ordinárias de condição inicial (EDO). O ajuste do modelo aos dados experimentais é feito pelo calculo do melhor conjunto de parâmetros, que tornam mínima a diferença entre os dados previstos pelo modelo e os dados experimentais. O problema de estimação de parâmetros em EDO pode ser resolvido mediante: a diferenciação dos dados experimentais para a obtenção direta dos valores das velocidades de reação, o uso de equações algébricas conhecido como método diferencial, pela integração analítica (quando o modelo é simples) ou numérica das EDO do modelo, ajustando-se o modelo aos dados

diretamente medidos que é o chamado método de integração indireto (BONOMI & SCHMIDELL, 2001).

Na maioria dos casos, a estimação de parâmetros resulta ser um problema de regressão não linear, envolvendo o uso de métodos numéricos de minimização da função objetivo através de procedimentos iterativos. No caso de ajuste de parâmetros, a função objetivo a ser minimizada reflete o resíduo calculado entre os valores experimentais e os valores simulados das variáveis de estado (BONOMI & SCHMIDELL, 2001).

A avaliação do modelo matemático consiste na realização de uma analise estatística que visa validar o modelo, seguida da identificação da necessidade da realização de novos experimentos com o objetivo de aprimorar o conhecimento do processo, visando melhorar a qualidade do modelo.

4.3.1 Análise de sensibilidade

A analise de sensibilidade de um sistema refere-se a uma alteração na variável de saída (resposta) que pode ser atribuída a uma mudança em um dos parâmetros do sistema. Uma medida da sensibilidade tem valor significativo, pois permite avaliar as possíveis alterações na saída do sistema (BURKET, 2003). A sensibilidade é avaliada mediante a utilização do método de análise de respostas, sendo determinado o fator de sensibilidade pela equação 37.

$$SF = \frac{\frac{V_{outc} - V_{outr}}{V_{outr}}}{\frac{V_{inc} - V_{inr}}{V_{inr}}}$$
(37)

Onde:

SF : fator de sensibilidade

Vout: variável de saída

V_{in}: variável de entrada

- r : índice que se refere á condição standard
- c : refere-se á condição alterada

4.4 Simulação

A simulação é a utilização dos modelos matemáticos gerados de maneira que os mesmos reproduzam o comportamento real do sistema, tendo em vistas a otimização, e ainda permite a extrapolação deste comportamento (BONOMI & SCHMIDELL, 2001). Dependendo do ponto de vista, o problema poder ser:

a) Simulação estática: refere-se a sistemas que estão operando em regime permanente, isto, é independente do tempo.

b) Simulação dinâmica: este tipo de simulação é a representação do sistema que varia com o tempo. Normalmente, é trabalhado com equações diferenciais ordinárias (EDO) no tempo para biorreatores operando em batelada, ou durante o transiente para sistemas contínuos; pode ser trabalhado ainda com equações diferenciais parciais no tempo e espaço, quando é avaliado o comportamento de biorreatores tubulares.

No mercado existem vários pacotes ou software capazes de resolver este tipo de equações. O MATLAB (*Matrix Laboratory*) é um software para computação numérica e visualização de alta performance, fácil de ser usado, onde os problemas e soluções são expressos quase da mesma forma que no papel. Seus elementos básicos são matrizes que não requerem dimensionamento. Ele permite implementar e resolver problemas matemáticos muito mais rápidos e eficientemente que através de outras linguagens como C, Basic, Pascal ou Fortran. O SIMULINK é um programa utilizado para modelagem, simulação e análise de sistemas dinâmicos. Simular um modelo no SIMULINK significa resolver numericamente um conjunto de equações diferenciais ordinárias. Para isso,

encontra-se disponível um conjunto de métodos de integração. Infelizmente, devido à diversidade de comportamentos dinâmicos que os sistemas podem apresentar, não existe um método único capaz de garantir sempre a melhor exatidão e eficiência de simulação. Logo, a escolha do método e dos parâmetros de simulação é crucial para uma simulação apurada.

4.4.1 Simulink

O programa SIMULINK se aplica a sistemas lineares e não lineares, contínuos e/ou discretos no tempo. Utiliza uma interface gráfica com o usuário para construção dos modelos a partir de diagramas em blocos, através de operações de clique-e-arraste do mouse. Com esta interface podem-se criar modelos da mesma forma que se faz com papel e caneta (MATHWORK, 2004).

Após a definição do modelo, a simulação pode ser feita com diferentes algoritmos de resolução, escolhidos a partir dos menus do SIMULINK ou da linha de comando do MATLAB. Os menus são particularmente convenientes para o trabalho interativo, enquanto a linha de comando tem sua utilidade na simulação repetitiva na qual se deseja somente mudar parâmetros. Usando osciloscópios (*Scopes*) ou outros visualizadores, têm-se o resultado gráfico da simulação enquanto esta está sendo executada. Os resultados da simulação podem ser exportados para o MATLAB para futuro processamento ou visualização. As ferramentas de análise de modelos incluem ferramentas de linearização e ajuste (*Trimming*) que podem ser acessadas a partir da linha de comando do MATLAB, assim como várias ferramentas do MATLAB e suas TOOLBOXES específicas. Sendo o MATLAB e o SIMULINK integrados, pode-se simular, analisar e revisar os modelos em qualquer dos dois ambientes (MATHWORK, 2004).

O SIMULINK possui a habilidade de simular sistemas discretos (dados amostrados). Os modelos podem ter múltiplas taxas de amostragem e conter tanto blocos discretos como contínuos. Todos os blocos discretos encontrados nas bibliotecas possuem embutido um amostrador nas

41

entradas e seguradores de ordem zero nas saídas. O período de amostragem é introduzido na caixa de diálogo dos blocos. Normalmente o período de amostragem é definido por um escalar; contudo, é possível definir um *offset* ao período, usando um vetor de 2 elementos no mesmo campo. Nos sistemas puramente discretos, para obtermos a informação somente nos períodos de amostragem, basta selecionar o passo de integração mínimo maior que o passo de integração máximo (MATHWORK, 2004).

4.4.2 Simulink Parameter Estimtion®

O Simulink Parameter Estimation é um produto base para a estimativa SIMULINK usado para os parâmetros do modelo a partir de dados experimentais. Permite realizar a estimação transiente, ou seja, estimar parâmetros de saída, e logo compará-los à história do modelo e aos dados experimentais para uma dada entrada. Mediante a utilização de uma condição inicial de estimação podem ser estimadas as condições iniciais dos estados com os dados experimentais. Também, permite estimar os valores da tabela de pontos de interrupção fixados por meio de medidas do sistema físico (MATHWORK, 2004).

Mediante a utilização do Simulink Parameter Estimation pode-se configurar o problema, especificar quais os parâmetros de estimação do modelo, importação e pré-processo dos dados experimentais, acompanhar o progresso de estimação, e finalmente validar os resultados da estimação por diversas parcelas (MATHWORK, 2004).

Este software compara os dados empíricos com os dados gerados por um modelo SIMULINK e mediante a utilização de técnicas de otimização, estima as condições dos estados iniciais e/ou parâmetros para que uma função custo para o utilizador selecionado, geralmente envolvendo o erro de mínimos quadrados entre os dois sinais de dados, seja minimizado (MATHWORK, 2004).

4.4.3 Análise numérica

O desempenho da simulação em termos de velocidade e exatidão, é função do modelo e das condições. No caso em que é difícil integrar, derivar ou determinar analiticamente algum valor específico de uma função, o computador pode ser utilizado para aproximar de uma forma numérica a solução desejada. O MATLAB possui ferramentas para resolver esses problemas mediante a utilização de métodos numéricos conhecidos como *solvers* (MATHWORK, 2004).

4.4.3.1 Solvers para problemas Non-stiff

Os problemas non-stiff podem ser resolvidos mediante a utilização das seguintes métodos.

a) ode45 é baseado na formula explicita de Runge-Kutta (4,5), e de Dormand-Prince. É um solucionador de uma etapa, em computação $y(t_n)$ é necessária apenas a solução no instante anterior, $y(t_{n-1})$. Em geral, ode45 é a melhor função a ser aplicada como uma "primeira tentativa" para a maioria dos problemas.

b) ode23, baseia-se no explícito de Runge-Kutta (2,3) e par de Bogacki Shampine. Pode ser mais eficiente do que a ode45 e na presença de uma rigidez moderada. A ode45, ode23 é um solucionador de uma etapa.

c) ode113, de ordem variável é baseado no método de Adams-Moulton Bashforth-solver PECE. Pode ser mais eficiente do que a ode45 e quando a função de ODE é particularmente elevada para avaliar. A ode113 é um solucionador de várias etapas, que normalmente tem as soluções em vários pontos do tempo anterior para calcular a solução atual.

4.4.3.2 Solvers para problemas Stiff

Os problemas *Stiff* apresentam termos de derivadas que variam muito rapidamente em diferentes faixas de integração. Os métodos tradicionais de integração divergem rapidamente para este tipo de equações. Solucionadores de problemas rígidos podem ser utilizados exatamente como os outros algoritmos. No entanto, muitas vezes pode-se melhorar significativamente a eficiência destes *solvers*, fornecendo-lhes informações adicionais sobre o problema. Existem quatro *solvers* projetados para os problemas de rigidez ou *stiff*.

a) ode15s: *solver* de ordem variável, é baseado nas fórmulas de diferenciação numérica (NDFs). Opcionalmente, ele usa as fórmulas para retroalimentar a diferenciação (*backward differentiation*), BDFs, (também conhecido como método de Gear). Como a ode113, ode15s é um *solver* de várias etapas. Se suspeitar que o problema é difícil ou se ode45 falhou ou foi muito ineficiente, pode utilizar-se a ode15s.

b) ode23s: baseia-se na fórmula Rosenbrock de segunda ordem. Porque é um solucionador de uma etapa, pode ser mais eficiente do que a tolerância da ode15s. Pode resolver alguns tipos de problemas para os quais ode15s não é eficaz.

c) ode23t: é uma aplicação da regra trapezoidal com uma "interpolação livre". Este *solver* pode ser utilizado para problemas de moderados a difíceis e se precisa de uma solução sem amortecimento numérico.

d) ode23tb: é uma aplicação de TR-BDF2, uma fórmula de Runge-Kutta implícita com uma primeira fase que é um passo regra trapezoidal e uma segunda fase que é uma fórmula para

retroalimentar a diferenciação (*backward differentiation*) de segunda ordem. Como ode23s, este solver pode ser mais eficiente do que a tolerância da ode15s.

Referências bibliograficas

- [1] AGUIAR-OLIVEIRA, E., Imobilização da enzima fructosyltransferase de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de fructooligosaccharides, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenaria de Alimentos, Campinas-SP, 112pp, 2007.
- [2] AGUIAR-OLIVEIRA, E., MAUGERI, F., Characterization of the Immobilized Fructosyltranferase from *Rhodotorula* sp., International Journal of Food Engenering, v.6(3), Article 9, DOI: 10.2202/1556-3758.1894, <u>http://www.bepress.com/ijfe/vol6/iss3/art9</u>
- [3] ANTOŠOVÁ, M., POLAKOVIČ, M., Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides, Chemical Papers - Chemicke Zvesti, v.55, p. 350-358, 2001.
- [4] ARROYO, M., Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, Ars Pharmaceutica, v.39(2), p. 23-39, 1988.
- [5] BAILEY, J. E., Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past accomplishment and future opportunities, Biotechnology Progress, v.14, p. 8-20, 1998.
- [6] BAILEY, J. E., OLLIS, D. F., Biochemical Engineering, McGraw Hill Chemical Engineering Series; 2nd ed.; 984pp., 1986.
- BHATIA, I. S., NANDRA, K. S., Studies on fructosyl transferase from Agave americana, Phytochemistry, v.18, p. 923-927, 1979.
- [8] BLANCH, H. W., CLARK, D. S., Biochemical Engineering, Marcel Dekker, New York; 702pp., 1997.
- [9] BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado, Editora Interciência, Rio de Janeiro, 506pp, 2008.
- [10] BORNET, F.R. Undigestible sugars in food products. American Journal of Clinical Nutrition, v.59(3), p. 763S–769S, 1994.

- [11] BONOMI, A., SCHMIDEELL, W., Processos Fermentativos e enzimáticos. In: BORZANI,
 W., SCHIMIDELL, W., LIMA. U.A., AQUARONE, E., Biotecnologia industrial, V.3. Edgard
 Blűcher Ltda, São Paulo, 616pp, 2001.
- [12] BOUHNIK, Y., Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans, Nutrition and Cancer, v.26, p. 21–29, 1996.
- [13] BURKET, C. A. V., Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, 159pp., 2003.
- [14] BUZZINI, P., MARTINI, A, GAETANI, M., TURCHETTI, B., PAGNONI, U. M., DAVOLI,
 P., Optimization of carotenoid production by Rhodotorula graminis DBVPG 7021 as a function of trace element conentration by means of response surface analysisis. Enzyme and Microbial Technology, v.36(5-6), p. 687-692, 2005.
- [15] CHAPLIN, M. F., BUCKE, C., Enzyme Tecnhology, Cambridge University Press, 264pp, 1990.
- [16] CHIANG, C. J., LEE, W. C., SHEU, D. C., DUAN, K. J., Immobilization of betafructofuranosidases from Aspergillus on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. Journal of Biotechnology Progress, v.13, p. 557-582, 1997.
- [17] CHIBATA, I., TOSA, T., Immobilized microbial cells and their applications. Trends in Biochemical Sciences, v.5, p. 88-90, 1980.
- [18] CHIEN, C. S., LEE, W. C., LIN, T. J., Immobilization of Aspergillus japonicus by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. Enzyme and Microbial Tecnhology, v.29, p. 252-257, 2001.

- [19] CHEN, W. C., LUI, C. H., Production of β-fructofuranosidase by Aspergillus japonicus. Enzyme and Microbial Technology, v.18, p. 153-160, 1996.
- [20] CHENG, C. Y., DUAN, K. J., SHEU, D. C., LIN, C. T., LI, S. Y., Production of fructooligosaccharides by immobilized Mycelium of Aspergillus japonicus. Journal of Chemical Technology and Biotecnhology, v.66, p. 135-138, 1996.
- [21] CRUZ, R., CRUZ, V. D., BELINI, M. Z., BELOTE, J. G., VIEIRA, C. R., Production of fructooligosaccharides by the myeclia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. Biosource Technology, v.65, p. 139-143, 1998.
- [22] DE BACKER, L., WILLART, R. G., BARON, G. V., Modelling of immobilized bioprocess. In: Willart RG, Baron GV, De Backer L, Editors. Immobilized living cell systems: Modelling and experimental methods, Jonh Wiley & Sons Ltd., England, p. 47-66, 1996.
- [23] DIXON, M., WEBB, E. C., Enzymes, 3rd Ed., Academic Press, New York, 1116 pp., 1979.
- [24] DUAN, K.J., CHEN, J. S., SHEU, D. C., Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. Enzyme and Microbial Technology, v.6, p. 334-339, 1994.
- [25] DUTTA, R., Immobilized enzyme, in: Fundamentals of Biochemical Engineering (Hardcover) Spinger, p. 50-69, 2008.
- [26] EVANGELISTA, J., Microorganismos e enzimas de utilização industrial de alimentos, In: Tecnologia de alimentos. Atheneu: Rio de Janeiro, p.245-276, 1987.
- [27] FISHBEIN, L., KAPLAN, M., GOUGH, M., Fructooligosaccharides: a review, Veterinary and Human Toxicology, v.30(2), p. 104-107, 1988.
- [28] FUKAI, K., MIYAZAKI, S., NANJO, F., HARA, Y., Distribution of carbohydrates and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Science and Nutrition, v.39(3), p.567-571, 1993.

- [29] FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M., Microbiologia dos Alimentos, Editora Atheneu, São Paulo, 182 pp., 2003.
- [30] FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D. C., Microbiología de los alimentos, 3^a. Ed.; Editorial Acribia S.A., Zaragoza, 522 pp., 1991.
- [31] GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B., Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, Journal of Nutrition, v.125, p. 1401–1412, 1995.
- [32] GHAZI, I., DE SEGURA, A. G., FERNANDEZ-ARROJO, L., ALCALDE, M., YATES, M., ROJAS-CERVANTES, M. L., PLOU, F., BALLESTEROS, A., Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.35, p. 19-27 (2005).
- [33] GOTO, K., FUKAI, K., HIDIKA, J., NANJO, F., HARA, Y., Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v.59, p. 2346-2347, 1995.
- [34] GOTO, S., SAITO, T., Liquid-solid mass transfer in basket type three-phase reactors, Journal of Chemical Engineering of Japan, v.17, p. 324-327, 1984.
- [35] HARTEMINK, R., VANLAERE K. M. J., ROMBOUTS, E. M., Growth of enterobacteia on fruto-oligosaccharides, Journal of Applied Microbiology, v.383, p. 367-374, 1997.
- [36] HAYASHI, S., TOBUCHI, M., TAKASAKI, Y., IMADA, K., Long-term continuos reaction of immobilized β-fructofuranosidase, Biotechnology Letters, v.16, p. 227-228, 1994.
- [37] HAYASHI, S., HAYASHI, T., KINOSHITA, J., TAKASAKI, Y., IMADA, K., Immobilization of β-fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524 on porous silica. Journal of Industrial Microbiology, v.9, p. 247-250, 1992.

- [38] HAYASHI, S., NONOGUCHI, M., TAKASAKI, Y., UENO, H., IMADA, K., Purification and properties of β-fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. Journal Industrial Microbiology, v.7, p. 251-256, 1991.
- [39] HERNAIZ, M. J., CROUT, D. H. G., Immobilization/stabilization on Eupergit C of the bgalactosidase from *B. circulans* and an a-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, Enzyme and Microbial Technology, v.27, 26-32, 2000.
- [40] HERNALSTEENS, S., MAUGERI, F., Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp., Applied Microbiology and Biotechnology, v.79, p. 589-596, 2008.
- [41] HIDAKA, M., EIDA, T., TAKIZAWA, T., TOKUNAGA, T., TASHIRO, Y., Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health, *Bifidobacterium Microflora*, v.5, p. 37-50, 1986.
- [42] HIDAKA, H., HIRAYAMA, M., SUMI, N. A., Fructooligosaccharides-producing enzyme from Aspegillus niger ATCC 20611, Agricultural and Biological Chemistry, v.52, p. 1181-1187, 1988.
- [43] HIRAYAMA, M., SUMI, N., HIDAKA, H., Purification and properties of a fructooligosaccharides-producing β-fructofuranosidase from Aspergillus niger ATCC 20611, Agricultural and Biological Chemistry, v.53, p. 667-673, 1989.
- [44] INGHAM, J., DUNN. I. J., HEINZLE, E., PRENOSIL, J. E., SNAPE, J. B., Chemical Engineering Dynamics, VHC Publishers INC, New York, 645pp, 2007.
- [45] JOVETIC, S., BEEFTINK, H. H., TAMPER, J., MARINELLI, F., Diffusion of acylated antibiotic A40926 in alginate and carrageenan beads with or without cells and/or soybean meal. Enzyme and Microbial Technology, v.28, 510-514, 2001.

- [46] JUNG, K. H., YUN, J. W., KANG, K. R., LIM, J. Y., Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. Enzyme and Microbial Technology, v.11, p. 491-494, 1989.
- [47] KIDA, M., YOSHIKAWA, T., SENDA, T., YOSHINIRO, Y., Formation of fructooligosaccharides from sucrose catalizad by immobilized β-fructofuranosidase originated from Aspergillus oryzae, Nippon Kagaku Kaishi, v.11, p. 1830-1835, 1988.
- [48] KIM, B. W., KNON, H. J., PARK, H. Y., NAM, S. W., PARK, J. P., YUN, J. W., Production of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. Bioprocess Engineering, v.23, p. 11-16, 2000.
- [49] KIM, S. K., BYUM, H. G., KANG, T. J., SONG, D. J., Enzymatic hysrolisis of yellowfin sole skin gelatin in a coninuous hollow fiber membrane reactor, Bulletin of the Korean Fisheries Society, v. 26, p. 120-132, 1993.
- [50] KRONENBURG, N., MUTTER, M., VISSER, H., BONT, J., WEIJERS, C. Purification of an epoxide hydrolase from *Rhodotorula glurinis*, Biotechnology Letters, v.21, p. 519-524, 1999.
- [51] 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.
- [52] LEVINS, D., GLASTONBURY, J., Particle-Liquid Hydrodynamics and Mass transfer in a Stirred Vessel Part II – Mass Transfer. Transactions of the Institution of Chemical Engineering, v.50, p. 132-146, 1972.
- [53] L'HOCINE, L., WANG, Z., JIANG, B., XU, S., Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from Aspergillus niger AS0023, Journal of Biotechnology, v.81, p. 73-84, 2000.

- [54] MADLOVA, A., ANTOSOVA, M., BARATHOVA, M., POLAKOVIC, M., STEFUCA, V., BALES, V., Screening of microorganisms for transfructosylating activity and optimization of biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides, Chemical Papers, v.53(6), p.366-369, 1999.
- [55] MATEO, C., PALOMO, J. M., FUENTES, M., BETANCOR, L., GRAZU, V., LÓPEZ-GALLEGO, F., PESSELA, C. C., HIDALGO, A., FERNANDÉZ-LORENTE, G., FERNANDÉZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins; Enzyme and Microbial Technology, v.39, p. 274-280, 2006.
- [56] MATHWORK, Simulink 6.0 Using Simulink, The MathWork, Inc., USA, 846pp, 2001.
- [57] MAUGERI, F., AGUIAR-OLIVEIRA, E., Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico. Brazilian Patent PI 070683-1, 2007.
- [58] MAUGERI, F., PINHEIRO, S. A., Produção de xarope de açúcar contendo frutose e glicose, enriquecido ou não com frutooligossacarídeos, a partir de sacarose, Brazilian Patente PI 0202602-3, 2002.
- [59] MODLER, H. W., Bifidogenic factors sources, metabolism and applications. International Dairy Journal, v.4, p.383-407, 1994.
- [60] MOLIS, C., Flourie, B., Ouarne, F., Gailing, M. F., Lartigue, S., Guibert, A., Bornet, F., Galmiche, J. P., Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans, Americam Journal of Clinical Nutrition, v.64(3), p. 324-328, 1996.
- [61] NOGUEIRA, D. A. R., Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 89pp, 1999.

- [62] OHYAMA, T., YASUYOSHI, S., IKARASHI, T., MINAMISAWA, K., KUBOTA, M., TSUKIHASHI, T., ASAMI, T., Composition of storage carbohydrate in tubers of Yacon (*Polymnia sonchifolia*), Soil Science and Plant Nutrition, v.36(1), p.167-171, 1990.
- [63] ONDERKOVA, Z., BRYJAK, J., POLAKOVIČ, M., Properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* immobilized on an acrylic carrier. Chemical Papers, v.65(5), p. 359-363, 2007.
- [64] PAPINUTTI, L., DIMITRIU, P., FORCHIASSIN, F., Stabilization studies of Fomes sclerodermeus laccases, Bioresource Technology, v.99, p. 419-424, 2008.
- [65] PARK, Y. K., ALMEIDA, M. M., Production of fructooligosaccharides from sucrose by transfructosylase from Aspergillus niger, Word Journal of Microbiolofy and Biotechnology, v.7, p. 331-334, 1991.
- [66] PARK, J.P., BAC, J.T., YUN, J.W., Critical effect of ammonium ions on the enzymatic reaction of a novel transfructosylating enzyme for fructooligosaccharide production from sucrose. Biotechnology Letters, v.21, 987-990, 1999.
- [67] PATIL, V. B., PATIL, N. B., Purification and immobilization of fructosyltransferase for production of fructooligosaccharides from sucrose, Indian Journal of Experimetal Biology, v.37, p. 830-834, 1999.
- [68] PASSOS, L. M. L., PARK, Y. K., Fructooligosaccharides: implicações na saúde humana e utilização em alimentos, Ciência Rural, v.33, p. 385-390, 2003.
- [69] PLATOVÁ, Z., POLAKOVIČ, M., ŠTEFUCA, V., VANDÁKOVÁ, M., ANTOŠOVÁ, M., Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*, Chemical Papers, v.60, p. 469-472, 2006.
- [70] RESHMI, R., SANJAY, G., SUGUNAN, S., Immobilization of α-amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis, Catalysis Communications, v.8, p. 393-399, 2007.

- [71] ROBERFROID, M., Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparin their physiological effects, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.33(2), p.103-108, 1993.
- [72] ROSE, A., HARRISON, J., *Rhodotorula glutinis*, fat synthesizing yeast. In Rose, A., Harrison, j. (Eds), The yeast, vol.3. Academic Press, London/New York, 698pp, 1987.
- [73] RUBIO, M. C., RUNCO, R., NAVARRO, A. R., Invertase from strain of *Rhodotorula glutinis*, Phytochemistry, v.61, p. 605-609, 2002.
- [74] RUSHTON, J. H., COSTICH, E. W., EVERETT, H. J., Power characteristics of mixing impeller I and II. Chemical Engeneering Progress, v.46, p. 395-467, 1950.
- [75] SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., PRAPULLA, S. G., Production of fructosyltransferase by Aspergillus oryzae CFR 2002 in solid-state fermentation using agricultural by-products, Applied Microbiology and Biotechnology, v.65, p. 530-537, 2004.
- [76] SCOTT, C. D., Immobilized cells: a review of recent literature, Enzyme and Microbial Technology, v.9, p. 66-73, 1987.
- [77] SHIOMI, N., Purification and characterization of 6F-fructosyltransferase from the roots of asparagus, Carbohydrate Research, v.96, p.281-292, 1981.
- [78] SHIN, H. T., BAIG, S. Y., LEE, S. W., SUH, D. S., KWON, S. T., LIM, Y. B., LEE, J. H., Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulanscells*, Bioresource Technology, v.93, p. 59-62, 2004.
- [79] SHIN, H. T., PARK, K. M., KANG, K. H., OH, D. J., LEE, S. W., BAIG, S. Y., LEE, J. H., Novel method for cell immobilized and its application for production of oligosaccharides from sucrose, Letters in Applied Microbiology, v.38, 176-179, 2004.
- [80] SPIEGEL, J., Safety and Benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technology, v.48, p. 85-89, 1994.

- [81] STEYN, D.G. Honey. In: Birch, G.G., Green, L.F. (ed) Molecular structure on function of food carbohydrate. New York, Toronto : John Wiley & Sons, 1973. p.35–207.
- [82] TANRISEVEN, A., ASLAN, Y., Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, v.36, p. 550-554, 2005.
- [83] THESHIMA, H., OHASHI, Y., Particle to liquid mass transfer in a rotating catalyst basket reactor. Journal of Chemical Engineerinf of Japan, v.10, p. 70-72, 1977.
- [84] TREVAN, M. D. Immobilized Enzymes an Introduction and Applications in Biotechnology; John Wiley & Sons; New York; 138 pp.; 1980.
- [85] VAN BALKEN, J., VAN DOOREN, T., VAN DEN, T. W., KAMPHUIS, J., MEIJER, E. M., Production of 1-kestose with intact mycelium of Aspergillus phoenicus contining sucrose-1^F-frucctosyltransferase, Applied Microbiology and Biotechnology, v.35, p. 216-221, 1991.
- [86] Vitolo M. Tópicos de enzimológia industrial. São Paulo: Litográfica Corsário Ltda, 1981. 65p.
- [87] Woodward J. in: Immobilized cells and enzymes: a practical approach; IRL Press; Washington, 175pp (1985).
- [88] YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKAMURA, M., Effects of frutooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects, Nutrition Research, v.4, p. 961-966, 1984.
- [89] YECH, Y., Singled-cell protein of *Rhodotorula sp.* Y38 from ethanol, acetic and acetaldeyde, Biotechnology Letters, v.18, p.411-416, 1996.
- [90] YUN, J. W., Fructooligosaccharides: occurrence, preparation, and application, Enzyme and Microbial Technology, v.19, p. 107-117, 1996.
- [91] YUN, W., SUH, K. H., SONG, S. K., Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by a dual immobilized enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase, Journal of Biotechnology and Bioengineering, v.10, p. 9-14, 1995.

- [92] YUN, J. W., JUNG, K. H., JEON, Y. J., LEE, J. M., Continuous productions of frutooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*, Journal of Microbiology and Biotechnology, v.2, p. 98-101, 1992.
- [93] YUN, J. W., JUNG, K. H., OH, J. W., LEE, J. H., Semibatch production cells of Aureobasidium pullulans, Applied Biochemistry and Biotechnology, v.24/25, p. 299-308, 1990.
PARTE II

ARTIGO 1:

KINETIC STUDIES AND MODELING OF THE PRODUCTION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDE BY FREE FRUCTOSYLTRANSFERASE FROM *Rhodotorula* sp.

Estudo cinético e modelagem para a produção de frutooligossacarídeos pela enzima frutosiltransferase de *Rhodotorula* sp. na forma livre

(Chemical Product and Process Modeling)

em avaliação

Kinetic studies and modeling of the production of fructooligosaccharide by free fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

Mónica B. Alvarado-Huallanco, Francisco Maugeri Filho Food Engineering, Department, Bioprocess Engineering Laboratory, Food Engineering School - State University of Campinas P.O. Box 6121 – 13083-862- Campinas – SP, Brazil.

Corresponding author

Tel.: +1935214052 Fax: +1935214027 e-mail: maugeri@fea.unicamp.br (F. Maugeri).

Abstract

Fructosyltransferase was produced by a strain of *Rhodotorula*, isolated from flowers collected in the costal Atlantic Forest located in Southern Brazil and screened according to the ability to produce the enzyme. The production was carried out in submerged fermentation and subsequently purified using the following three procedures: alcohol precipitation, Q-Sepharose ion-exchange chromatography and ultrafiltration. The studies of fructooligossacaride production were carried out in a batch stirred reactor using sucrose as the substrate and 5 U_{TF}/mL of fructosyltransferase at pH 4.5 and 50°C. Since the industrial application for this enzyme does not require a highly purified enzymatic solution, the enzyme kinetics were comparatively performed using both purification degree: partially purified (only alcohol precipitated enzyme) and purified (using all steps specified above). The kinetics showed a characteristic Michaelis-Menten behavior with substrate inhibition effects at high sucrose concentrations (up to 70% w/v). Additionally, glucose competitive inhibition relating to the sucrose, 1-kestose and nystose uptakes were verified. An inhibitory effect was also noticed with high concentrations of fructose (over 50%) but considered meaningless since the fructose concentration is always low in the actual medium reaction. The hydrolyzing activity over nystose was found to be significant, so it was included in the mathematical model. The initial values for the kinetic constants, K_m , V_m and K_i , for each substrate were obtained, and then fine-tuned by simulations, after a parameter sensitivity analysis being carried out. The model predictions fitted well the experimental data, either for the purified or partially purified enzyme, while different set of adjusted parameters were used in each case. Model predictions for FOS production were not higher than 5% deviation in both cases, so they can be used for bioreactor designs.

Keywords: Fructosyltransferase; *Rhodotorula* sp.; fructooligosaccharides; transfructosylating kinetics; mathematical modeling and simulation.

1. Introduction

Fructosyltransferase was an enzyme known for catalyzing the transformation of sucrose into fructooligosaccharides (FOS), which are sugars with beneficial functional properties in the proliferation of bifidobacteria in the human colon, and classified as probiotics. This enzyme is produced in the extra and intracellular forms from different microorganisms, including *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus awamori, Aureobasidium* sp., *Aureobasidium pullulans, Aspergillus japonicus, Aspergillus phoenicus and Arthobacter* sp. (Hidaka et al., 1986).

Currently, there are different opinions about transfructosilation. Some authors, such as Chiang et al. (1997), classified it as the reaction catalyzed by β -fructofuranosidase or invertase (FFase EC 3.2.1.26); others, such as Rubio et al. (2002), Yun (1996), Antošová and Polakovič (2001) and L'Hocine et al. (2000) classified it as a β -D-fructosyltransferase (FTase, EC 2.4.1.9) reaction. In the latter case, in high sucrose concentrations the enzyme shows transferase activity, but at low concentrations it shows hydrolytic activity.

Fructooligosaccharides are produced according to the chain reaction shown below (Jung et al., 1989 and Duan et al., 1994), producing the following sugars at the end of the syntheses: glucose (G), fructose (F), sucrose (GF), 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) and fructosylnystose (GF₄).

$$GF_n$$
 + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}

The enzyme used in this work was produced extracellularly by a yeast strain of *Rhodotorula*, isolated and characterized by Hernalsteens and Maugeri (2008), and was able to synthesize fructooligosaccharides with excellent yields from sucrose. The main goal of this work was to describe a kinetic mathematical model for fructooligosaccharide synthesis using both the partially purified, and the purified enzyme, using sucrose as substrate. The two enzyme purification grades were used in order to estimate in what extension the contaminants can interfere in the kinetic parameters and also to verify how reliable can be the mathematical model use in view of a process design, in both situations, since for FOS production the enzyme don't need to be highly purified.

2. Material and Methods

2.1. Microorganism and cultivation conditions

Rhodotorula sp. was isolated from the Atlantic Forest in Southern Brazil and screened by Hernalteens and Maugeri (2008) and maintained at the Laboratory of Bioprocess Engineering-UNICAMP-Brazil, on GYMP agar medium at 4°C. The medium used for both the inoculum and for enzyme production. The standard medium, consisting (per liter) of: 50 g sucrose, 20 g yeast extract, 10 g NaNO₃, 0.5 g MgSO₄.7H₂O and 5 g K₂HPO₄ (pH 4.5). The inoculum was incubated at 30°C and 150 rpm for 24 hours. For enzyme production, was carried out with the culture medium, consisting of a quantity of molasses performing 60 g/L of reducing sugars and 70 g/L of corn step water, both previously pretreated as follow: 4% (w/v) of active charcoal is added to the mixture and allowed 10 minutes under stirring, at 150 rpm and 60°C. The suspension is then centrifuged at 6000 x g, at 5°C, for 10 minutes (Mendes, 2006); solids are discarded and the clarified supernatant liquid used as fermentation medium. The fermentations were carried out without pH control, with 1.5 VVM aeration, at 30°C and 650 rpm for 36 h, in a three-liter BioFlo III (New Brunswick Scientific-Edison N.J., USA) fermenter. After cultivation, the cells were separated by centrifugation (6000 x g, 5°C and 10 minutes), discarde, and the cells-free extract solution used as the enzyme source. The was enzyme recovered as follows: ethanol was added to the supernatant to 50 rpm solution at -20°C up to a final concentration of 70% (v/v), in a magnetic stirred reactor at 2°C, with mild agitation. The precipitate was centrifuged (6000 x g, 5°C and 10 minutes), recovered and re-dissolved in sodium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5), and stored at -20°C as partially purified enzyme (PPE).

2.2. Enzyme purification

The above recovered and redissolved enzyme solution was applied to an anionic column (HiLoadTM 16/10 Q-Sepharose® Fast Flow – Pharmacia Biotech) and equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5). The non-adsorbed proteins were eluted with the starting buffer and the adsorbed proteins enzymes eluted with a linear gradient of NaCl (0 to 1 M) in the same buffer at a flow rate of 1 mL/min. Active fractions were concentrated by ultrafiltration on Centricon YM-30 (Amicon, Millipore), according to Hernalteens and Maugeri (2008). In addition, active fractions were concentrated by ultrafiltration, active fractions were as purified enzyme (PE).

2.3. Enzyme assay

The reaction medium used to determine enzyme activity consisted of 50% (w/v) sucrose (in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) and 10% (v/v) of adequately diluted enzyme solution at 50°C. Samples were collected at regular time intervals during the 30 min of reaction time, and used

to quantify glucose with commercial glucose-oxidase kits (Laborlab, Guarulhos/SP/Brazil) and reducing sugars by the Somogi-Nelson method (Somogyi, 1945 and Nelson, 1944).

Sucrose conversion by fructofuranosidase yields glucose and fructose, however when a transfructosylating activity is effective, part of the fructose is built into a fructan polymer. By measuring the amounts of glucose and reducing sugars released into the reaction medium, the hydrolytic and transfructosylating activities can thus be assessed (Chen and Lui, 1996). The equation below allows the determination of the activities by estimating glucose (G) and reducing sugars (RS) in the reaction media (F: fructose, F_T : transferred fructose):

RS = F + G and F = RS - G

However

 $F_T = G - F$

so

 $F_T = 2G - RS$

Thus the activity $(\mu mol min^{-1})$ was calculated as:

 $U_F = RS$

and

 $U_{\rm TF} = 2G - RS$

where U_F is the hydrolytic activity and U_{TF} is the transfructosilating activity. One unit of fructofuranosidase activity (FA) is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse 1 µmol of sucrose per minute. One unit of transfructosylating activity (FTA) is defined as the amount of enzyme required to transfer 1 µmol of fructose (F_T) per minute.

2.4. Determination of the kinetic parameters

The kinetic parameters were determined in duplicate at 50°C by means of the initial rates procedures. Sucrose (5 to 90 %, w/v), 1-kestose and nystose (5 to 35% w/v) and enzyme (5 U_{TF}/mL) were incubated in sodium acetate buffer (pH 4.5). Samples were taken and the enzyme was inactivated by heating in boiling water for 5 minutes and the sugars analyzed using the HPLC-PAD DIONEX (USA) System DX-500 to determine the amounts of glucose, fructose, GF₂, GF₃ and GF₄ produced.

2.5. Fructooligosaccharide production

The assays were carried out in triplicate using sucrose (5 to 70% w/v), at 50°C in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 and 5 U_{TF} /mL of enzyme. Aliquots were taken at regular intervals and the enzyme inactivated by heating for 5 minutes in boiling water, and then analyzed using the HPLC-PAD DIONEX System DX-500, with a Carbopac PA-100 column equilibrated with 50 mM NaOH, and eluted with a linear gradient (0 – 30%) of 500 mM sodium acetate in 50 mM NaOH (1 mL/min). The standards kestose, nystose e fructofuranosyl-nystose were purchased from Wako Dako Industries (USA), and glucose, fructose and sucrose from Merk (Brazil).

3. Results and discussion

3.1. Fructooligosaccharide production

FOS was produced by both purified and partially purified samples of fructosyltransferase. In both cases, the maximum yield in FOS became independent of the sucrose concentration after 24 h of reaction, the sucrose concentrations ranging from 50% of sucrose and 5 U_{TF} /mL of immobilized enzyme. However, the yields were 7% higher for the purified enzyme than for the partially purified one: about 57% for the purified and 50% for the partially purified enzymes (Figure 1). The average

compositions of the reaction mixtures were as follows: GF_2 (44 %), GF_3 (9 %) and GF_4 (1.5 %), for the former, and GF_2 (41 %), GF_3 (9 %) and GF_4 (1 %) for the latter (PPE).

In both cases, the sucrose was rapidly converted into 1-kestose and glucose. The maximum concentration of 1-kestose (GF_2) was reached in 24 h. The 1-kestose produced was gradually converted into nystose (GF_3). The nystose increased and was later transformed into fructosylnystose (GF_4). The reaction time indicated that a lower sucrose concentration favored the faster reaction, producing higher GF_3 concentrations (Figure 1). According to Ballesteros et al., (2006) the transferase/hydrolase ratio and hence the maximum yield in FOS, depend basically on the sucrose concentration and the intrinsic enzyme properties. The FOS yields increasing with increasing sucrose concentration. However, in this work, the yields in FOS were practically independent of the sucrose concentration.

The synthesis of FOS by the purified enzyme from *Rhodotorula* sp. is as efficient as that reported for other enzymes. Hidaka et al. (1988) reported the results with *Aspergillus niger* to be 60% of FOS after 24 h of reaction with 50% sucrose and 6 UI. Yun (1996), working with immobilized cells of *Aspergillus niger* and *Aerobasidium pullulans*, Hayashi et al. (1992), using the enzyme from *Aspergillus japonicus*, and Yun et al. (1990) and Hayashi et al. (1991) working with the fructosyltransferase from *Aspergillus pullulans*, obtained FOS yields ranging from 55 to 60%. In addition, *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aspergillus pullulans* CFR 77 produced 50-55% FOS (Sangeetha et al., 2004) and Chien et al. (2001), using the immobilized mycelia of *Aspergillus japonicus* in gluten, reached a maximum of about 61% of FOS. Hirayama et al. (1989) using *Aspergillus pullulans* KCCM 12017 obtained 46% of FOS using sugar cane molasses. Therefore, the results of 57% yield obtained in this work showed that the fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. is an effective enzyme for FOS productions.



Figure 1. FOS production at 50°C, pH 4.5 and 50% of sucrose. for (a) Partially purified enzyme and (b) Purified enzyme. Bars indicate the standard deviations.

3.2. Kinetic parameters

The effects of the initial sucrose (5 to 90% w/v), 1-kestose and nystose (5 to 35% w/v) concentrations were studied at 50°C, pH 4.5 with an enzyme activity of 5 U_{TF} /mL. The enzyme kinetics showed a characteristic Michaelis-Menten behavior with substrate inhibition effects at high sucrose concentrations (higher than 70% w/v), as shown in Figure 2 tosucrose converted. The time course reaction indicated that lower sucrose concentrations favored faster reaction times, resulting in a greater production of GF₃.



Figure 2. Initial velocity of sucrose as a function of substrate concentration at pH 4.5, 50°C and $5U_{TF}/mL$ of enzyme. Bars indicate the standard deviations.

The inhibitory effects of glucose and fructose were studied using concentrations from 5 to 20% (w/v), using sucrose, 1-kestose and nystose as substrates. Glucose showed a competitive inhibitory effect on sucrose, 1-kestose and nystose uptake (Figure 3). Fructose only exhibited an inhibitory effect at concentrations above 50%, which was considered to be meaningless, since the fructose concentration (Figure 3b) in the reaction mixture would never reach such a value and therefore would have no significant effect on the reaction kinetics. However, when the nystose concentration reached about 5% (w/v) significant hydrolytic activity was detected and this could not be neglected, so it was included in the model. Therefore, the transfructosylating reactions were substantially inhibited by glucose when accumulating in the later stages of the reaction. The K_m , V_{max} and K_i values for each substrate were determined using the Lineweaver-Burk plot, as shown in Figure 3.

All estimated parameters are put together in Table 2, where it can be seen that the partially purified and purified enzymes show different behaviors, the kinetic parameters for the purified enzyme being lower for all the saturation constants, meaning greater affinity for the substrates. Additionally, a similar value for the sucrose inhibition constant was found, meaning that inhibition by sucrose is similar for both kinds of enzyme, and, interestingly, a much lower value for the nystose hydrolytic constant was found, which means that nystose is much less hydrolyzed when the synthesis is carried out with the purified enzyme, resulting in a higher conversion to FOS.

Similar kinetics for fructosyltransferase with sucrose as substrate have been reported, using enzymes from other microorganisms, such as that reported by Duan et al. (1994) for the enzyme from *Aspergillus japonicus*, whose V_{max} values were 41.3, 30.7 and 11.7 g/L.h, K_m were 93.4, 349.5 and 338.4 g/L, the glucose inhibitor constants being 23.6, 35.3 and 10.3 g/L for GF, GF₂ and GF₃, respectively, and the hydrolytic constant (K_m) being 428.9 g/L and V_{max} equal to 5.8 g/L.h. Comparing the enzyme from *Rhodotorula* sp with that from *Aspergillus japonicus*, the one from *Rhodotorula* has lower saturation constant related to GF₂ production and higher saturation constants related to GF consumption and GF₃ production. On the other hand, the enzyme from *Aureobasidium pullulans* (Jung et al., 1989) showed different kinetic behavior, since it is not affected by substrate inhibition. Some other studies can be found in the literature concerning the kinetics of fructosyltransferase, but they are partial studies with no information about the possible effects of all the different components in the reaction mixture, such as the studies using the enzyme from *Aureobasidium pullulans* (Jung et al., 1989), *Aspergillus niger* (L'Hocine et al., 2000), *A. pullulans* (Yoshikawa et al., 2007), *A. niger* ATCC 20611 (Hirayama et al., 1989), and *Aureobasidium* sp (Sangeetha et al., 2004).





71

3.3. Mathematical modeling

The fructooligosaccharides are produced according to the chain reaction shown below (Jung et al., 1989 and Duan et al., 1994):

$$2 \operatorname{GF} \to \operatorname{GF}_2 + \operatorname{G} \tag{1}$$

$$2 \operatorname{GF}_2 \to \operatorname{GF}_3 + \operatorname{GF} \tag{2}$$

$$2 \operatorname{GF}_3 \to \operatorname{GF}_4 + \operatorname{GF}_2 \tag{3}$$

$$GF_3 \rightarrow GF_2 + F$$
 (4)

The mathematical model was proposed based on the above reactions and on the kinetics observed in the production of fructooligosaccharides from sucrose.

According to the mechanism above (equation 1), 2 moles of GF produce 1 mol of GF_2 and 1 mol of G. Including the inhibition by the substrate and competitive inhibition by glucose the sucrose reaction rate can be represented by equation 5.

$$\frac{dGF}{dt} = \frac{-V_{ms} \times GF}{GF(1 + GF/K_{ss}) + K_{ms}(1 + G/K_{gs})} + \frac{342}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_2}{GF_2 + K_{mk}(1 + G/K_{gk})}$$
(5)

The glucose production rate is according to equation (6).

$$\frac{dG}{dt} = \frac{180}{2 \times 342} \frac{V_{ms} \times GF}{GF(1 + GF / K_{ss}) + K_{ms}(1 + G / K_{gs})}$$
(6)

The GF_2 production rate includes G inhibition, where GF_2 is produced by the transfructosylating reaction of two molecules of GF (equation 1), the transfructosylating reaction of

two molecules of GF_3 (equation 3) and the hydrolysis of GF_3 (equation 4), and consumed to form GF_3 and GF (equation 2).

$$\frac{dGF_2}{dt} = \frac{-V_{mk} \times GF_2}{GF_2 + K_{mk} (1 + G/K_{gk})} + \frac{504}{2 \times 342} \frac{V_{ms} \times GF}{GF (1 + GF/K_{ss}) + K_{ms} (1 + G/K_{gs})} + \frac{504}{2 \times 666} \frac{V_{mn} \times GF_3}{GF_3 + K_{mn} (1 + G/K_{gn})} + \frac{504}{666} \frac{V_{mnh} \times GF_3}{GF_3 (1 + GF_3/K_{snh}) + K_{mnh}}$$
(7)

The GF₃ production rate is given by the transfructosylating reaction of two molecules of GF_2 (equation 2), the consumption of GF_3 by the transfructosylating reaction to form GF_2 and GF_4 (equation 3), less its own hydrolysis (equation 4), all of these reactions being inhibited by G.

$$\frac{dGF_{3}}{dt} = \frac{-V_{mn} \times GF_{3}}{GF_{3} + K_{mn}(1 + G/K_{gn})} + \frac{-V_{mnh} \times GF_{3}}{GF_{3}(1 + GF_{3}/K_{sn}) + K_{mnh}} + \frac{666}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_{2}}{GF_{2} + K_{mk}(1 + G/K_{gk})}$$
(8)

The GF_4 production rate is according to equation 3, where 2 moles of GF_3 produce 1 mol of GF_4 and 1 mol of GF_2 , resulting in equation 9.

$$\frac{dGF_4}{dt} = \frac{828}{2 \times 666} \frac{V_{mn} \times GF_3}{GF_3 + K_{mn}(1 + G/K_{gn})}$$
(9)

The production rate of F (equation 10) is according to reaction 4, where one mol of GF_3 gives one mol of GF_2 and F.

$$\frac{dF}{dt} = \frac{180}{666} \frac{V_{mnh} \times GF_3}{GF_3 (1 + GF_3 / K_{sn}) + K_{mnh}}$$
(10)

In the above equations the glucose inhibition constants for each substrate are included, as well as the conversion factors represented by the molecular weight of each substrate. Therefore, the model was described by six ordinary differential equations

3.4. Parametric sensitivity analysis

The first attempt to compare the experimental data with data from the mathematical model described by equations 5 to 10, using the parameters experimentally determined, showed poor fitting. Therefore, a fine tuning of the parameters had to be done, and this was accomplished on the basis of a parametric sensitivity study. The sensitivity of a system refers to a change in output variable that can be attributed to a change in one of the parameters of the system. As one measure, the sensitivity has a very significant contribution, because it allows evaluation of changes in the output of the system. In order to check the influence of the process variables of the synthesis of FOS, we used the factor of sensitivity given by equation 11 (Burket, 2003), where V_{out} is the output variable (FOS production), V_{in} is the input variable (kinetic parameters), the subscript *r* is the reference condition and the *c* is the changed condition. Data from the sensitivity factor can be interpreted as the percentage change in output variable for 1% change of input. This factor represents the gain (FS positive) or loss (FS negative). The response or output variable was given by the total production of FOS.

$$FS = \frac{\frac{V_{outc} - V_{outr}}{V_{outr}}}{\frac{V_{inc} - V_{inr}}{V_{inr}}}$$
(11)

In this study we investigated all the parameters with a change of 25% in the input variables. The model equations were simultaneously integrated using the SIMULINK of MATLAB software. Table 1 shows the responses obtained in terms of percentage of FOS and their sensitivity factors for the variables under study. It can be seen that the most relevant parameters are V_{mk} , K_{mk} and K_{gk} , which led to higher FS values. Relatively less influent but still relevant are the parameters V_{mn} , K_{mn} , K_{gn} , V_{mnh} and K_{mnh} . Therefore, focus should be put on these parameters in order to accomplish the parameter fine tuning with success. The remaining parameters V_{ms} , K_{ms} , K_{gs} , K_{ss} and K_{snh} show very low FS values and can be considered as no important concerning parameter adjusting.

Doromotor	Sensibility	FOS						
Parameter	(FS)	(%)						
V_{ms}	0.000	51.13						
K_{ms}	-0.003	51.10						
K_{gs}	0.003	51.16						
K _{ss}	-0.003	51.10						
V_{mk}	-0.269	48.38						
K _{mk}	0.192	53.09						
\mathbf{K}_{gk}	-0.139	49.71						
V_{mn}	0.067	51.82						
K _{mn}	-0.061	50.50						
K_{gn}	0.036	51.50						
\mathbf{V}_{mnh}	-0.092	50.18						
\mathbf{K}_{mnh}	0.094	52.09						
K _{snh}	0.000	51.12						

 Table 1. Parametric sensitivity analysis (FS) and compared with FOS production (51.13% standard) after 96 h

3.6 Fine-tuning of the kinetic parameters

The model was again integrated using the SIMULINK of MATLAB software, however using this time the Parameter Estimation from its library for the fine-tuning of the kinetic parameters. The new parameters values are shown in the Table 2, together with experimental ones, for purified and partially purified enzyme. As it can be noticed, some kinetic parameters were significantly changed. Constants V_{mn} , V_{mnh} , K_{gn} , K_{sn} decreased significantly, and were important in the production rate of GF₃, GF₄ and F. For constants K_{gs} and K_{gn} , they also changed significantly due to its influence in the production rate of G and GF₃, respectively. On the other hand, V_{ms} and K_{sn} showed no significant influence in the final FOS concentration, however they affected significantly the consumption rate of GF, and therefore they changed as well. Parameter K_{ms} , K_{ss} , K_{mk} , K_{mn} and K_{mnh} changed also, but more slightly. If the kinetics parameters from Table 2 are compared, it can be noticed that practically all parameters changed, some of them a great deal, while others slightly, in spite of results from the parametric sensitivity, which signalized that some of them could stay the same. This can be explained by the fact that the variable response used in this process was the final concentration of total FOS, which may not represent the actual changes in the reaction kinetics. Therefore, another response variable, for example the correlation coefficient for each curve, could be more suitable and give more confident results. However, the final result is acceptable in terms of data fitting and deviation, as it can be seen in the validation step below.

The model predictions for sucrose concentrations from 50% and 70% (w/v) were compared to the experimental data for partially purified and purified enzymes. The data in Table 3 indicate that for 50% of sucrose a better fit of the model to the experimental data were found for frutosyltransferase, with deviations of about 4% with respect to the total amount of FOS produced after 96 hours. The results showed correlation coefficient R values higher than 0.97 for the partially purified enzyme and purified enzyme. The predictions and experimental data for the purified enzyme with sucrose concentrations of 50 and 70% are plotted in Figures 4 and 5.

GF			GF ₂				
		Exp.	Adj			Exp.	Adj.
V _{ms}	PPE	87.8±2.90	97.4	V _{mk}	PPE	20.4±1.38	30.3
	PE		82.6		PE		18.9
K _{ms}	PPE	187.9±18.73	230.1	K _{mk}	PPE	142.4±2.34	185.4
	PE		220.1		PE		132.4
Kas	PPE	275 0+8 23	75.4	Kak	PPE	50 1+2 54	145.2
gs	PE	2701020.20	49.9	gк	PE	001122101	60.4
V		705 0100 45	742.0				
K _{ss}	PPE	/85.0±23.45	743.2				
	PE	~ = 3	/30.0			an h	
GF_3^a			GF ₃ ^b				
		Exp.	Adj.			Exp.	Adj.
\mathbf{V}_{mn}	PPE	70.0±9.03	18.1	V_{mnh}	PPE	47.0±5.12	15.6
	PE		16.6		PE		10.4
K_{mn}	PPE	766.5±24.96	766.4	\mathbf{K}_{mnh}	PPE	485.0±18.58	475.3
	PE		471.5		PE		445.8
Kan	PPE	104 7+16 59	597	Ken	PPE	446 0+9 76	255.0
gn	PE	1011/210.59	48.2	311	PE	110.0±9.70	79.0
PPE, partially purified enzyme; PE, purified enzyme.							
V_{m} , g/Lh; K_{m} , K_{i} , g/L							
GF, sucrose; GF ₂ , 1-kestose; GF ₃ , nystose.							
^a Transfructosylating reaction with nystose as the substrate.							
^b Hydrolyzing reaction with nystose as the substrate.							

 Table 2. Kinetic parameters for fructosyltransferase using different substrates.

According to the predictions of the mathematical model formulated to describe sucrose conversion by *Rhodotorula* sp. fructosyltransferase at 50°C and pH 4.5, the results can be considered satisfactory, showing that the mathematical model can be considered as a valid tool for the prediction and design of a FOS production process, either with purified or unpurified fructosyltransferase.

	Experi	mental	•				
	PPE	PE	PPE	RED _{ppe}	PE	RED _{pe}	
50 % GF							
GF ₂	13.56±1.6	21.98±1.4	13.60	0.29	23.35	2.51	
GF ₃	24.39±1.4	24.51±2.4	23.91	1.97	24.77	5.68	
GF ₄	7.23 ± 2.2	8.34±2.2	8.50	17.56	8.75	13.78	
FOS	45.18±1.4	54.83±1.4	46.01	1.83	56.87	5.77	
70 % GF							
GF ₂	17.08±2.4	26.30±1.6	16.65	6.23	27.86	5.93	
GF ₃	28.14±1.8	24.00 ± 1.8	26.54	1.06	25.40	5.83	
GF_4	7.40 ± 2.6	5.68 ± 2.4	6.38	3.91	6.40	12.67	
FOS	52.601±1.8	55.98 ± 1.4	49.57	3.72	58.33	4.19	
PPE, partially purified enzyme; PE, purified enzyme.							
GF ₂ , 1-kestose; GF ₃ , nystose; GF ₄ , fructosylnystose.							
RED, Relative error deviation between experimental data and model predictions, (%).							

Table 3. FOS production (%) using fructosyltransferase after 96 h of reaction.



Figure 4. Model predictions (lines) and experimental data (average of data in triplicate) (symbols), for 500 g/L sucrose (50°C, pH 4.5) using a partially purified (a) and purified (b) fructosyltransferase. Bars indicate the standard deviations.



Figure 5. Model predictions (lines) and experimental data (average of data in triplicate) (symbols), for 700 g/L sucrose (50°C, pH 4.5) using a partially purified (a) and purified (b) fructosyltransferase. Bars indicate the standard deviations.

4. Conclusion

A purified *Rhodotorula* sp. fructosyltransferase yielded about 57% of FOS after 24 h of synthesis, which were higher than the yield obtained with partially purified enzyme (about 50%), for sucrose concentrations of from 50 to 70% (w/v). This was attributed to contaminant enzymes in the partially purified enzyme, which increased GF_3 hydrolysis, increasing the fructose production. The kinetic studies showed the presence of sucrose substrate inhibition (up to 70%) and glucose competitive inhibition. Competitive inhibition by glucose was also observed when using 1-kestose and nystose as substrates, and in addition there was hydrolytic activity over nystose. The purified enzyme was more efficient than the partially purified one, as reflected in the kinetic constants. However, as far as modeling is concerned, there were no significant differences in predicting the

FOS production, either with purified or partially purified enzyme. Therefore, the mathematical model can be used for both enzyme conditions, when parameters are accordingly found, and can be considered predictive and a valid tool for the design of a FOS production bioreactor.

Nomenclature

- F fructose concentration (g/L)
- FS sensibility factor
- G glucose concentration (g/L)
- GF sucrose concentration (g/L)
- GF₂ 1-kestose concentration (g/L)
- GF₃ nystose concentration (g/L)
- GF₄ fructosylnystose concentration (g/L)
- K_{gk} competitive inhibition constant by glucose for 1-kestose as the substrate (g/L)
- K_{gn} competitive inhibition constant by glucose for nystose as the substrate (g/L)
- K_{gs} competitive inhibition constant by glucose for sucrose as the substrate (g/L)
- K_{mk} saturation constant for 1-kestose (g/L)
- K_{mn} saturation constant for nystose (g/L)
- K_{mnh} saturation constant for nystose in the hydrolyzing activity (g/L)
- K_{ms} saturation constant for sucrose (g/L)
- K_{snh} inhibition constant of the hydrolyzing activity over nystose (g/L)
- K_{ss} inhibition constant for sucrose as the substrate (g/L)
- V_{in} input variable
- V_{mk} maximum velocity of transfructosylating activity for 1-kestose as the substrate (g/L.h)
- V_{mn} maximum velocity of transfructosylating activity for nystose as the substrate (g/L .h)

 V_{mnh} maximum velocity for the hydrolyzing activity for nystose as the substrate (g/L.h)

 V_{ms} maximum velocity for sucrose as the substrate (g/L .h)

V_{out} output variable

subscript

- *c* changed condition
- *r* reference condition

Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- Antošová M., Polakovič M., Fructosyltransferase: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides, *Chemical Papers Chemicke Zvesti*, 2001, 55, 350-358.
- Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M., Ferrer M., García-Arellano H., Reyes-Duarte D., Ghazi I.,.
 In: Enzymatic synthesis of sugar esters and oligosaccharides from renewable resources.
 Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industries, CRC Press, New York, 2006, p. 465-490.
- Burket, C., Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeolitas. Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineer, Brazil; 2003.
- Chen W.C., Lui C.H., Production of β-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus, Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18, 153-160.

- Chiang C.J., Lee W.C., Sheu D.C., Duan K.J., Immobilization of beta-fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides, *Journal of Biotechnology Progress*, 1997, 13, 557-582.
- Chien C.S., Lee W.C., Lin T.J., Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides, *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, 29, 252-257.
- Hidaka M., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T., Tashiro Y., Effect of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health, *Bifidobacterium Microflora*, 1986, 5, 37-50.
- Duan K.J., Chen J.S., Sheu D.C., Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose, *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16, 334-339.
- Hayashi S., Hayashi T., Kinoshita J., Takasaki Y., Imada K., Immobilization of βfructofuranosidase from Aureobasidium sp. ATCC 20524 on porous silica, Journal of Industrial Microbiology, 1992, 9, 247-250.
- Hayashi S., Kinoshita J., Nonoguchi M., Takasaki Y., Imada K., Continuous production of 1kestose by β-fructofuranosidase immobilized on Shirasu porous glass, *Biotechnology Letter*, 1991, 13, 395-398.
- Hernalsteens S., Maugeri F., Purification and characterisation of a fructosyltransferase from Rhodotorula sp., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79, 589-596.
- Hirayama M., Sumi N., Hidaka H., Purification and properties of a fructooligosaccharidesproducing β-fructofuranosidase from Aspergillus niger ATCC 20611, Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53, 667-673.
- Jung K.H., Yun J.W., Kang K.R., Lim J.Y., Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose, *Enzyme and Microbial Technology*, 1989, 11, 491-494.

- L'Hocine L., Wang Z., Jiang B., Xu S., Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023, *Journal of Biotechnology*, 2000, 81, 73-84.
- Mendes G.L., Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo de batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados. Msc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineer, Brazil; 2006.
- Nelson N., Aphotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, Journal of Biological Chemistry, 1944, 153, 375-380.
- Rubio M.C., Runco R., Navarro A.R., Invertase from strain of *Rhodotorula glutinis*, *Phytochemistry*, 2002, 61, 605-609.
- Sangeetha P.T., Ramesh M.N., Prapulla S.G., Production of fructosyltransferase by Aspergillus oryzae CFR 2002 in solid-state fermentation using agricultural by-products, Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65, 530-537.
- Somogyi M.A., A new reagent for the determination of sugar, *Journal of Biological Chemistry*, 1945, 160, 61-68.
- Yoshikawa J., Amachi S., Shinoyama H., Fujii T., Purification and some properties of βfructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404, *Journal of bioscience and bioengineering*, 2007, 103, 491-493.
- Yun J.W., Fructooligosaccharides: occurrence, preparation, and application, *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19, 107-117.
- Yun J.W., Jung K.H., Oh J.W., Lee J.H., Semibatch production cells of *Aureobasidium pullulans*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1990, 24/25, 299-308.

ARTIGO 2:

KINETICS AND MODELING OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDE SYNTHESIS BY IMMOBILIZED FRUCTOSYLTRANSFERASE

FROM Rhodotorula sp.

Cinética e modelagem da síntese de frutooligossacarídeos pela enzima frutosiltransferase imobilizada a partir de *Rhodotorula* sp.

Rhodotorula sp.

(Journal of Chemical Technology and Biotechnology)

DOI: 10.1002/jctb.2477

Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp.

Mónica B. Alvarado-Huallanco, Francisco Maugeri-Filho

Food Engineering Department, University of Campinas

* Correspondence to: Francisco Maugeri, Department of Food Engineering, UNICAMP, P.O Box 6121, CEP 13083-86, Tel.: +19 3521 4052 Fax: +19 3521 4027, E-mail: maugeri@fea.unicamp.br

Background: Fructosyltransferase synthesizes fructooligosaccharides from sucrose. Data used in this work were obtained by an enzyme produced by *Rhodotorula* sp., a microorganism isolated from fruit samples from the Brazilian Atlantic Forest, which was immobilized in an inorganic support, consisting of a niobium and graphite alloy.

Result: All essays were conducted using enzymes at two purification grades, highly and partially purified enzymes, as comparison. The results were not significantly different between the two enzyme grades, mainly concerning the final fructooligossacharides yield, which were around 46%. Concerning the kinetics, the enzyme follows Michaelis-Menten equation with inhibition by sucrose (above 60%). Also, a competitive inhibition by glucose was observed on sucrose, kestose and nystose uptakes. The immobilization of the enzyme was by ion exchange on the surface of the particles, since the support is a charged and compact solid, with negligible porosity. The mathematic model includes mass balances, considering the resistance to external mass transfer. A parameter sensitivity analysis and parameter fitting were performed by simulations and the model was validated by comparison to experimental data.

Conclusion: The model fitted well experimental data, with deviations lower than 5% concerning FOS concentrations, indicating that it can be used in the design and control of bioreactors, either using purified or partially purified enzyme.

87

Keywords: Fructosyltransferase; *Rhodotorula* sp.; fructooligosaccharides; transfructosylating kinetics; immobilized enzyme, mathematical modeling and simulation.

NOMENCLATURE

- C substrate concentration in bulk solution (g L^{-1})
- C_s substrate concentration in external surface (g L⁻¹)
- D Diameter of the shaker shovels (m)
- $D_{(s)}$ coefficient of diffusivity of solute in solvent (m h⁻¹)
- d_p biocatalyst particle diameter (m)
- F fructose concentration (g L^{-1})
- G glucose concentration $(g L^{-1})$
- GF sucrose concentration (g L^{-1})
- GF_2 1-kestose concentration (g L⁻¹)
- GF_3 nystose concentration (g L⁻¹)
- GF_4 fructosylnystose concentration (g L⁻¹)
- K_B Boltzmann constant
- K_{gk} competitive inhibition constant by glucose for 1-kestose as substrate (g L⁻¹)
- K_{gs} competitive inhibition constant by glucose for sucrose as substrate (g L⁻¹)
- K_{gn} competitive inhibition constant by glucose for nystose as substrate (g L⁻¹)
- K_L mass transfer coefficient (m h⁻¹)
- K_m saturation constant (g L⁻¹)
- K_{mk} saturation constant for 1-kestose (g L⁻¹)
- K_{mnh} saturation constant for nystose for the hydrolyzing activity (g L⁻¹)
- K_{ms} saturation constant for sucrose (g L⁻¹)'
- K_{mn} saturation constant for nystose (g L⁻¹)

- K_{snh} inhibition constant for the hydrolyzing activity for nystose as substrate (g L⁻¹)
- K_{ss} inhibition constant for sucrose as substrate (g L⁻¹)
- N agitation frequency (rpm)
- R_o radius of the solute (m)
- P power consumed (W)
- SF sensitivity factor
- Sh Sherwood number
- T temperature of reaction (K)
- V_{in} input variable
- V_{mk} maximum velocity of transfructosylating activity for 1-kestose as substrate (g L⁻¹ h⁻¹)
- V_{mn} maximum velocity of transfructosylating activity for nystose as substrate (g L⁻¹ h⁻¹)
- V_{mnh} maximum velocity for the hydrolyzing activity for nystose as substrate (g L⁻¹ h⁻¹)
- V_{ms} maximum velocity for sucrose as substrate (g L⁻¹ h⁻¹)
- V_{out} output variable
- V_r liquid volume of the reactor (L)
- W fluid mass

Greeks

- ϵ Power per unit mass (Watt g⁻¹)
- μ sucrose viscosity (g m⁻¹ h⁻¹)
- v cinematic viscosity (g m⁻¹ h⁻¹)

subscript

c changed condition

m bulk phase

- *r* reference condition
- s surface of the biocatalyst particle

INTRODUCTION

The fructosyltransferase enzyme is used in the production of FOS, considered prebiotics since they selectively support probiotic microorganism growth, as *Lactobacillus acidophillus* and *Bifidobacterium bifidus*, leading to a series of benefits to health.¹

The β -frutofuranosidase enzymes, from different sources, have been immobilized in calcium alginate,^{2,3} in glass or porous silica,^{4,5} ion-exchange resins,^{6,7} and in gluten.⁸

The immobilized enzymes present some changes in their physical and chemical properties after the immobilization process, such as alteration in the enzymatic activity and kinetic stability and higher half-lives. Immobilization also enables the reuse of the catalyst and continuous process operation, eases the separation of products and leads to the reduction of operational costs. Overall, immobilized enzymes, compared to the free enzymes, have better thermal and pH stabilities, they are easy to separate and can be reused continuously. The efficiency of immobilization depends on the proprieties of the support, enzyme nature and immobilization conditions.⁸

According to Aguiar-Oliveira,⁹ the fructosyltransferase enzyme immobilized on a support based on niobium presented a shift to more basic range in its pH profile, after immobilization. This behavior can be explained by the negative charge of the support.

The kinetic properties of the enzyme are altered with the immobilization, due to conformational modifications that the enzyme molecule undergoes at the active site. However, the global reaction rate depends on the resistances against substrate mass transfer from the bulk medium to the active site, within the catalyst particle. And these resistances generate substrate concentration gradients,

whose intensity depends on the mass transfer mechanism. In general, the choice of the support, medium and parameters of operation should be focused in the reduction of these effects.¹⁰

The enzyme immobilization generate the phenomena of mass transfer resistances, which are important as limiting factors, therefore, they can affect the overall rate of the reaction. If we consider these phenomena and follow a hypothetical path of the substrate from the liquid to the reaction site of the immobilized enzyme, it will go through the following steps: (1) transfer from a liquid phase to the liquid layer of the mixture around the immobilized enzyme, and (2) a relative diffusion through the liquid layer (external mass transference); and (3) diffusion through the particle surface into the inert support until reaching the enzyme active site (internal mass transference). If an enzyme is immobilized on the surface of an insoluble particle, the path is composed by steps (1) and (2), where the mass transfer rate is proportional to the driving force.¹⁰

Duan *et al.*¹¹ according to studies conducted by Jung *et al.*,¹² proposed a reaction mechanism for the production of fructooligosaccharides. This work indicated that the formation of fructooligosaccharides occurs from a consecutive set of reactions, $GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$. The main goal of this paper is the dynamic modeling and simulation of the FOS synthesis by immobilized fructosyltransferase on a niobium alloy support.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism and cultivation conditions

Rhodotorula sp. was isolated from the Atlantic Forest in southern Brazil, screened by Hernalteens and Maugeri,¹³ and is maintained on GYMP agar medium at 4°C. Both inoculum and enzyme production were carried out with the same culture medium, consisting of a quantity of molasses performing 60 g L⁻¹ of reducing sugars and 70 g L⁻¹ of corn step water, both previously pretreated as follow: 4% (w/v) of active charcoal is added to the mixture and allowed 10 minutes under stirring,

at 150 rpm and 60°C. The suspension is then centrifuged at 6000 x g, at 5°C, for 10 minutes;¹⁴ solids are discarded and the clarified supernatant liquid used as fermentation medium.

The inoculum was incubated at 30°C, under 150 rpm for 24 hours. The fermentations were carried out without pH control, with 1.5 VVM aeration, at 30°C and 650 rpm for 36 h, in a three-liter BioFlo III (New Brunswick Scientific-Edison N.J. USA) fermenter. After cultivation, the cells were separated by centrifugation (6000 x g, 5°C and 10 minutes), discarded, and the cell-free extract solution used as the enzyme source. The enzyme was subsequently recovered as follows: ethanol at -20°C was added to the solution up to a final concentration of 70% (v/v), in a magnetic stirred reactor, at 2°C, with mild agitation. The precipitate was centrifuged (6000 x g, 5°C), recovered, redissolved in sodium acetate buffer (0.05 M, pH 4.5), and stored at -20°C as partially purified enzyme (PPE).

Enzyme purification

The fermented crude solution was applied to an anionic column (HiLoad[™] 16/10 Q-Sepharose® Fast Flow – Pharmacia Biotech) and equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5). The non-adsorbed proteins were eluted with the starting buffer and the adsorbed proteins enzymes eluted with a linear gradient of NaCl (0 to 1 M) in the same buffer at a flow rate of 1 mL min⁻¹, according to Hernalteens and Maugeri.¹³ In addition, active fractions were concentrated by ultrafiltration on Centricon YM-30 (Amicon, Millipore), and then stored at -20°C as purified enzyme (PE).
Enzyme immobilization

Purified and partially purified enzymes were immobilized on an inorganic solid support consisting of an alloy of niobium and graphite according to works previously conducted by Maugeri and Aguiar-Oliveira.¹⁵

Enzyme assay

The reaction media to determine enzyme activity consisted of 10 ml of a 50% (w/v) sucrose solution in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5, containing 0.25 g of immobilized enzyme, and incubated at 50°C. Samples were collected at regular time intervals during the 30 min of reaction time, and used to quantify glucose with commercial glucose-oxidase kits (Laborlab, Guarulhos/SP/Brazil) and reducing sugars by the Somogi-Nelson method.^{16,17}

Sucrose conversion by fructofuranosidase yields glucose and fructose; however, when a transfructosylating activity is effective, part of the fructose is built into a fructan polymer. By measuring the amounts of glucose and reducing sugars released into the reaction medium, the hydrolytic and transfructosylating activities can thus be assessed.¹⁸ The equation below allows for the determination of the activities by estimating glucose (G) and reducing sugars (RS) in the reaction media (F: fructose, F_T : transferred fructose):

RS = F + G and F = RS - G

However

 $F_T = G - F$

so

 $F_T = 2G - RS$

Thus the activity $(\mu mol min^{-1})$ was calculated as:

 $U_F = RS$

and

 $U_{\rm TF} = 2G - RS$

where U_F is the hydrolytic activity and U_{TF} is the transfructosilating activity. One unit of fructofuranosidase activity (FA) is defined as the amount of enzyme required to hydrolyse 1 µmol of sucrose per minute. One unit of transfructosylating activity (FTA) is defined as the amount of enzyme required to transfer 1 µmol of fructose (F_T) per minute.

Determination of the apparent kinetic parameters

The kinetic parameters were determined in triplicate at 50°C by means of the initial rates. Sucrose (GF) (5 to 70 %, w/v), kestose (GF₂) and nystose (GF₃) (5 to 30%) and immobilized enzyme (5 U_I mL⁻¹) were incubated in sodium acetate buffer (pH 4.5). Glucose and fructose were added, in order to evaluate the inhibitory effects. Samples were taken and the enzyme was inactivated by heating in boiling water for 5 minutes and the sugars analyzed by using the HPLC-PAD DIONEX System DX-500 for glucose, fructose, GF₂, GF₃ and GF₄.

Determination of mass transfer coefficient

A standard stirred tank reactor with a diameter (D_i) of 6.5 cm, height (H) of 6.5 cm, and a volume (V_r) of 200 mL, was used, in which a system of 4 deflector of 0.65 cm height and 45° inclination was introduced. The agitation was performed by an impeller with 6 blades with a diameter (D_i) of 2.17 cm and a height (w) of 0.54 cm. The reactor was operated at 50°C with sucrose solution of 50% in a sodium acetate buffer (50mM, pH 4.5). The agitation had a constancy of 150 rpm. The mass transfer coefficient (K_L) in a stirred tank, with particles in suspension, was determined by the correlation expressed by equation 5 according to Levins e Glastonbury,¹⁹ which relates the Sherwood number to Reynolds number, Schmidt number and reactor geometric relations. One of

the parameters of Reynolds number in this equation is the dissipated power by mass unit (ϵ) determined by equation 3. However, to calculate ϵ is necessary the power number (equation 1), N_p, which is obtained by using the graphical relations by Rushton *et al.*,²⁰ which is a function of the Reynolds number (Re) for impellers (equation 2).

$$Np = \frac{P}{\rho_L N^3 D^5} \tag{1}$$

$$Re = \frac{\rho . N. D^2}{\upsilon}$$
(2)

$$\varepsilon = \frac{N_p \cdot N^3 \cdot D^5}{V_r} \tag{3}$$

The diffusivity of substrate in solution was determined by the equation of Stoke-Einstein (equation 4), which is the most used in liquid diffusions, where K_B is the Boltzmann constant, T is absolute temperature, μ is the viscosity of the solvent, and R_o is the radius of the solute. In this case, the substrate used was the sucrose, whose R_0 is equal to $4,4x10^{-8}$ cm. The average particle diameter, d_p , is 0.177 cm and K_B , Boltzmann constant, is equal to $1.38x10^{-16}$ g cm² K⁻¹ s⁻².

$$D(s) = \frac{K_B T}{6\pi . \mu . R_0} \tag{4}$$

$$Sh = \frac{K_L d_p}{D(s)} = 2 + 0.47 \left[\frac{d_p^{4/3} \cdot \varepsilon^{1/3}}{v} \right]^{0.62} \left[\frac{D_i}{D_t} \right]^{0.17} \left[\frac{v}{D(s)} \right]^{0.36}$$
(5)

Sucrose solution density and viscosity

The solution density of sucrose 50% (w/v) was determined by using a pycnometer for liquids and analytical balance of accuracy at a temperature of 50°C. A number of determinations of weight and

volumes were performed. The viscosity of the same solution was determined by using Brookfield viscometer at 50°C.

Fructooligosaccharide production

The assays were carried out in triplicate using sucrose (5 to 80% w/v), at 50°C in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 and 5 $U_I mL^{-1}$ of immobilized enzyme. Aliquots were taken at regular time intervals and then analyzed using the HPLC-PAD, all from Dionex (USA), with a Carbopac PA-100 column equilibrated with 50 mM NaOH, and eluted with a linear gradient (0 – 30%) of 500 mM sodium acetate in 50 mM NaOH (1 ml min⁻¹). The standards kestose, nystose e fructofuranosylnystose were purchased from Wako Dako Industries (USA), and glucose, fructose and sucrose from Merk (BRAZIL).

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme immobilization

After the production and purification of fructosyltransferase enzyme by *Rhodotorula* sp., and following the methodology described by Maugeri and Aguiar-Oliveira,¹⁵ the enzyme was immobilized on a niobium alloy support.

The yield of immobilization (Y_I) was calculated by using equation 6, defined by the ratio between the immobilized enzymatic activity, (U_i) , and the initial total activity (U_o) :

$$Y_{I} = \frac{U_{i}}{U_{o}} \cdot 100\%$$
(6)

The results of immobilization showed yields from 66% to 93 %, depending on the amount of free enzyme used in immobilization.

Synthesis of fructooligosaccharides

All reactions were carried out at 50°C, pH 4,5 and 5 U_I mL⁻¹. Yields of FOS, both for partially purified and purified enzymes were about 46 %, after 96 hours of synthesis. Fig. 1 shows the product formation from sucrose 50% as initial concentration. The final composition of FOS products were 34.07% of GF₂, 7.26% of GF₃, and 3.16% of GF₄, for the partially purified enzyme, and GF₂ of 33.92%, GF₃ of 9.01%, and GF₄ of 3.40% for purified enzyme.



Figure 1. FOS production by immobilized fructosyltransferase (50°C, pH 4.5, 5 $U_I mL^{-1}$,50% of sucrose). (A) Partially purified and (B) purified enzyme. Bars indicate the standard deviations.

These results are slightly different from the literature data. According to Cruz *et al.*,³ the FOS produced by mycelium of *A. japonicus*, immobilized in calcium alginate at pH 5,0-5,6 and at 55°C, led to a maximum FOS yield of 61% after 4 hours of synthesis with GF_2 30.5%, GF_3 26.5%, GF_4

4.3%, G 29%. The highest concentration of FOS from sucrose was firstly observed by Hidaka *et* $al.^{21}$ and Su *et al.*²² with conversion of 60% after 24 hours. Ghazi *et al.*,⁴ using *A. aculeatus* immobilized in bubbles of activated epoxy (covalent bond), obtained a FOS production of 61.5% from the sucrose concentration of 630 g L⁻¹ after 36 hours of reaction at 60°C, with GF₂ 38.0%, GF₃ 22.0%, and GF₄ 0.48%, using batch reactors and fixed bed. Cheng *et al.*² used a *A. japonicus* immobilized in calcium alginate gel, in fixed bed, at 42°C, with a continuous reaction during 35 days, with a loss of 17% of enzyme activity during this period, and with a FOS yield higher than 55%.

Park and Almeida²³ noticed a production increase of FOS when the sucrose concentration was increased from 30% to 60%, which was explained by the water competition and substrate used as acceptor in the reaction catalyzed by β -frutosyltranferase.

In this work, the yields of FOS with the enzyme immobilized on niobium are between 45% and 50%, from sucrose concentrations of 500 and 700 g L⁻¹ and 5 U_I mL⁻¹ of immobilized enzyme. However, these yields can be higher according to synthesis conditions, as the ones obtained by Aguiar-Oliveira and Maugeri,²⁴ with the same enzyme in optimized reaction conditions, whose FOS yields were about 58%, with GF₂ 61%, GF₃ 34.7%, and GF₄ 4.7% for a reaction time of 24 hours, using sucrose as substrate and 20 U_I mL⁻¹ of immobilized enzyme (pH 6,0 e 48°C).

Apparent kinetic parameters of immobilized enzyme

Assays were performed at different concentrations of sucrose, from 5 to 80% (w/v), for the synthesis of fructooligosaccharides at 50°C, pH 4.5 and 5 $U_I mL^{-1}$ of immobilized enzyme. The relation between substrate concentration and initial rates followed a hyperbolic curve. Therefore, lower concentrations of substrate led to first-order kinetics and the reaction rate increases as the substrate concentration increases, reaching a maximum and then decreasing following a substrate

inhibition kinetics, at concentrations above 600 g L⁻¹ of sucrose (Fig. 2(A)). The calculation of apparent kinetic parameters $V_{m,app}$ and $K_{m,app}$ for sucrose, kestose and nystose uptake, was performed according to the Lineweaver-Burk's technique of linearization, as shown in Fig. 2. The values of apparent kinetic constants are shown in Table 1.



Figure 2. Kinetic studies of immobilized fructosyltransferase (PPE); (A) initial rate as a function of sucrose concentration; Lineweaver-Burk plots for (B) sucrose uptake with addition of glucose (50 and 100 g L^{-1}). (C) 1-kestose uptake with addition of glucose (100 g L^{-1}), (D) nystose uptake with addition of glucose (100 g L^{-1}). Bars indicate the standard deviations.

In order to evaluate the inhibitory effect of glucose, experiments were carried out with fixed concentrations of sucrose and enzyme, with glucose and fructose concentrations changing from 50 to 100 g L⁻¹. It has been shown that the addition of glucose to the reaction medium led to a competitive inhibition (Fig. 2(B)), in which the values of $K_{i,app}$ for glucose as inhibitor were calculated by Lineweaver-Burk's technique, whose values are shown in Table 1. The addition of fructose from 50 to 100 g L⁻¹ didn't lead to significant variation, so that the inhibition by fructose was considered negligible.

The effects of glucose in the uptake rate of 1-kestose and nystose are shown in Figures 2(C) and 2(D), where the results indicate competitive inhibition effect by glucose. $V_{m,app}$ and $K_{m,app}$ for this reactions were estimated as well. Moreover, a hydrolytic activity over nystose was noticed, whose apparent constants were also calculated.

Enzyme kinetic after immobilization may suffer some sort of modification due to mass transfer limitation. The increase of K_m means that a higher concentration of substrate is necessary to the same reaction rate compared to the free enzyme.^{25,26} Aguiar-Oliveira,⁹ making use of the fructosyltransferase of *Rhodotorula* sp., determined a K_{ms} value of 299 g L⁻¹ for the free enzyme, however, a K_{ms} value of 370 g L⁻¹ at pH 4.5 and a K_{ms} value of 500 g L⁻¹ at pH 6.0 were obtained for the immobilized enzyme, both with 7 U₁.mL⁻¹ of enzyme activity. In studies not yet published, with free enzyme, Alvarado-Huallanco obtained K_{ms} around 187.9 g L⁻¹, and, in this present work, for purified immobilized enzyme the K_{ms} was around 263.73 g L⁻¹, in both cases at pH 4.5 and 5 U₁ mL⁻¹. Compared to data from free enzyme, the immobilized system showed a decrease of 60% in the V_{ms}, an increase of 20% in K_{ms} , and more than 55% increase in the K_{mk} , which was reflected in the yields achieved for GF₂, GF₃ and GF₄. Additionally, the immobilized system showed also an increase in the nystose hydrolysis constants (V_{mnh}, K_{mnh}), which indicates a faster fructose production.

GF				GF_2			
		App.	Int.			App.	Int.
V _{ms}	PPE	61.38 ± 17.4	35.00	V _{mk}	PPE	92.18 ± 2.8	40.23
$(g L^{-1}h^{-1})$	PE	39.08 ± 13.8	32.56	$(g L^{-1}h^{-1})$	PE	107.89 ± 3.2	38.53
				-			
K _{ms}	PPE	335.28 ± 23.8	383.81	\mathbf{K}_{mk}	PPE	880.00 ± 20.1	327.99
$(g L^{-1})$	PE	148.28 ± 15.4	263.73	$(g L^{-1})$	PE	750.89 ± 31.6	287.96
-							
K _{gs}	PPE	55.20 ± 21.8	27.79	K_{gk}	PPE	145.51 ± 43.1	15.51
$(g L^{-1})$	PE	54.79 ± 16.0	23.61	$(g L^{-1})$	PE	144.70 ± 15.7	14.23
K _{ss}	PPE	615.01 ± 30.7	615.01				
$(g L^{-1})$	PE	615.01 ± 24.2	615.10				1
GF_3^{a}				GF ₃ ^b			
	App. Int.					App.	Int.
V _{mn}	PPE	53.52 ± 15.7	10.08	V_{mnh}	PPE	44.55 ± 16.7	10.67
$(g L^{-1}h^{-1})$	PE	115.03 ± 14.2	9.10	$(g L^{-1}h^{-1})$	PE	4.67 ± 5.3	9.07
K _{mn}	PPE	735.03 ± 35.0	680.00	K _{mnh}	PPE	474.32 ± 13.9	310.33
$(g L^{-1})$	PE	735.48 ± 34.7	380.00	$(g L^{-1})$	PE	319.33 ± 19.1	269.32
K _{gn}	PPE	161.60 ± 33.1	60.60	K _{sn}	PPE	29.50 ± 8.4	33.00
$(g L^{-1})$	PE	154.12 ± 12.2	31.60	$(g L^{-1})$	PE	20.33 ± 13.0	30.60
PPE, partially purified enzyme; PE, purified enzyme.							
GF, sucrose; GF ₂ , 1-kestose; GF ₃ , nystose.							
App., apparent kinetic parameters; Int., intrinsic kinetic parameters.							
^a Transfructosylating reaction with nystose uptakte.							
^b Hydrolyzing reaction with nystose uptake.							

Table 1. Kinetic parameters for different substrates.

On the other hand, if the various apparent K_m values in Table 1, for both partially purified and purified immobilized enzymes, are compared, it can be seen that the kinetics of the purified enzyme is more favorable, since the K_m values for this enzyme condition are, in general, lowers for all reactions. Additionally, if we look at the glucose inhibition constant (K_g), they are rather equivalent for both enzymes, what means that the glucose inhibition effect is equivalent for either enzyme. In the case of the V_m values, what is remarkable is that the purified enzyme V_{mnh} value is significantly lower than the one for partially purified enzyme, what explains the higher yields with purified enzyme, since the hydrolysis reaction kinetics of nystose is much slower with the purified enzyme, and this may be due to a possible contaminant hydrolyzing enzyme in the partially purified enzyme solution.

Mathematical modeling

According to the model proposed by Jung *et al.*,¹² the synthesis of FOS is followed by the sequence $GF \rightarrow GF_2 \rightarrow GF_3 \rightarrow GF_4$, with a resultant increase in the K_m of the consecutive uptaking reaction of transfructosilation. Thereby, higher concentrations of oligosaccharides are always necessary for the synthesis of their homologous with one or more units of fructose. This explains why the content of 1-kestose is higher at the begging of the enzyme reaction, as sucrose is rapidly converted into GF_2 and GF_3 by transfructosilating reaction, while glucose accumulates in the medium.¹¹ Comparatively, in the syntheses catalyzed by the immobilized fructosyltransferase enzyme of *Rhodotorula*, the concentration of GF_2 increases continuously, as well as GF_3 and GF_4 , which is probably due to differences in the kinetic parameters between the different enzymes, what could be changed with the increase of catalytic activity of the enzyme, as observed by Aguiar-Oliveira.⁹ Concerning the support material, Aguiar-Oliveira⁹ reported that niobium presents an irregular surface with superficial pores, and the biocatalyst microphotographs proved that the immobilization happens on the particle surface. This can be evaluated by the apparent kinetic constants, which

are, in this present case of immobilized enzyme, significantly different from their homologous at the free enzyme system. Therefore, the external mass transfer process must be considered in the mathematical model.

The external mass transfer coefficient was determined from data of standard stirred reactor and by using the equation 5, as described in 2.6, in which the diffusivity coefficient of sucrose in solution was obtained by equation 4, which is equal to 3.06×10^{-7} m h⁻¹. The mass transfer coefficient (K_L),

was, by consequence, equal to 1.23×10^{-2} m h⁻¹. Furthermore, Damköhler number, Da, (Equation 7), which relates maximum velocities of reaction and external mass transfer, which was of 21.42, indicating that the process is limited by mass transfer. The effectiveness coefficient of the reaction, η , determined by equation 8, was 0.45, indicating that the effective reaction rate is less than half the theoretical reaction with no resistance to mass transfer.¹⁰

$$Da = \frac{maximum \ reaction \ rate}{maximum \ difusion \ rate} = \frac{V_m}{K_L K_m}$$
(7)

$$\eta = \frac{Observed \ reaction \ rate}{Hipothetic \ al \ reaction \ rate \ with \ no \ mass \ transfer \ resistence} = \frac{\frac{V_m C_s}{K_m + C_s}}{\frac{V_m C}{K_m + C}}$$
(8)

where V_m is maximum reaction rate at the surface of the support, K_L is the mass transfer coefficient, and C is the bulk substrate concentration, C_s is the substrate concentration at the support surface, and K_m is the saturation constant.

The model of the FOS synthesis reaction by fructosyltransferase, the equations 9 to 12, proposed by Duan *et al.*¹¹ and Jung *et al.*¹² were considered.

$$2 \text{ GF} \to \text{GF}_2 + \text{G} \tag{9}$$

$$2 \operatorname{GF}_2 \to \operatorname{GF}_3 + \operatorname{GF} \tag{10}$$

$$2 \operatorname{GF}_3 \to \operatorname{GF}_4 + \operatorname{GF}_2 \tag{11}$$

$$GF_3 \rightarrow GF_2 + F$$
 (12)

According to the experimental results, described above, glucose is a competitive inhibitor of the transfructosylating reaction of sucrose, 1-kestose and nystose.

Therefore, the dynamic mass balance of substrate and products in the solid phase, more precisely at the support surface without intra-particle diffusion, can be expressed by equations 13 to 18:

$$\frac{dGF_s}{dt} = K_L (GF_m - GF_s) - \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}}\right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}}\right)} + \frac{342}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}}\right)}$$
(13)

$$\frac{dG_s}{dt} = -K_L(G_s - G_m) + \frac{180}{2 \times 342} \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}}\right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}}\right)}$$
(14)

$$\frac{dGF_{2s}}{dt} = -K_L (GF_{2s} - GF_{2m}) - \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}}\right)} + \frac{504}{2 \times 342} \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}}\right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}}\right)}$$

$$+\frac{504}{2\times666}\frac{V_{mn}\times GF_{3s}}{GF_{3s}+K_{mn}\left(1+\frac{G_{s}}{K_{gn}}\right)}+\frac{504}{666}\frac{V_{mnh}\times GF_{3s}}{GF_{3s}\left(1+\frac{GF_{3s}}{K_{snh}}\right)+K_{mnh}}$$
(15)

$$\frac{dGF_{3s}}{dt} = -K_L(GF_{3s} - GF_{3m}) - \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gn}}\right)} - \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{sn}}\right) + K_{mnh}}$$

$$+\frac{666}{2\times504}\frac{V_{mk}\times GF_{2s}}{GF_{2s}+K_{mk}\left(1+G_{s}/K_{gk}\right)}$$
(16)

$$\frac{dGF_{4s}}{dt} = -K_L (GF_{4s} - GF_{4m}) + \frac{828}{2 \times 666} \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gn}}\right)}$$
(17)

$$\frac{dF_s}{dt} = -K_L(F_s - F_m) + \frac{180}{666} \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{sn}}\right) + K_{mnh}}$$
(18)

The mass balance of substrate and products in the liquid phase can be expressed by equations 19 to

24:

$$\frac{dGF_m}{dt} = -K_L(GF_m - GF_s) \tag{19}$$

$$\frac{dG_m}{dt} = K_L(G_s - G_m) \tag{20}$$

$$\frac{dGF_{2m}}{dt} = K_L(GF_{2s} - GF_{2m}) \tag{21}$$

$$\frac{dGF_{3m}}{dt} = K_L(GF_{3s} - GF_{3m}) \tag{22}$$

$$\frac{dGF_{4m}}{dt} = K_L (GF_{4s} - GF_{4m})$$
(23)

$$\frac{dF_m}{dt} = K_L(F_s - F_m) \tag{24}$$

Parametric sensitivity analysis

When experimental data were compared to model prediction with apparent constants, significant differences were detected. Therefore, parameter estimation was performed, which parameters have been nominated intrinsic ones, and carried out according to the sensitivity parameter study. The output variable for this study was the FOS production, and sensitivity factors (SF) were calculated according to equation 25,²⁷ where V_{out} is the output variable, V_{in} is the input variable, the index *r* refers to standard conditions and *c* refers to the changed condition.

$$SF = \frac{\frac{V_{outc} - V_{outr}}{V_{outr}}}{\frac{V_{inc} - V_{inr}}{V_{inr}}}$$
(25)

105

The sensitivity factor can be considered as the percentage of variation in the output variable, for 1% variation in the input variable. It can be taken as a gain (if positive) or loss (if negative). All parameters were evaluated according to a positive variation of 25% in the input variables and model equations integrated by using SIMULINK from MATLAB software. Table 2 shows the results of FOS yields in percentage of the respective variable sensitivity factors. As it can be seen in Table 2, the parameters most relevant were V_{ns} , K_{gs} , K_{mk} , V_{mn} , K_{gn} e K_{mnh} , which presented the higher values for SF. The SF values for parameters K_{ms} , K_{ss} , V_{mk} , K_{gk} , K_{mn} , V_{mnh} , K_{snh} e K_L were lowers, however they were also considered for the intrinsic parameters determination.

Table 2. Sensitivity Factor (SF) for different parameters, compared to standard FOS production (32.73%) after 96 h of reaction.

Doromotor	Soncitivity (SE)	FOS	
Faranneter	Sensitivity (SF)	(%)	
V _{ms}	0.085	33.280	
K_{ms}	-0.126	31.898	
K_{gs}	0.085	33.280	
K_{ss}	-0.005	32.690	
\mathbf{V}_{mk}	-0.336	30.524	
\mathbf{K}_{mk}	0.349	35.009	
K_{gk}	-0.162	31.664	
\mathbf{V}_{mn}	0.112	33.461	
\mathbf{K}_{mn}	-0.103	32.054	
K_{gn}	0.046	33.026	
\mathbf{V}_{mnh}	-0.167	31.630	
K _{mnh}	0.147	33.685	
\mathbf{K}_{snh}	-0.011	32.654	
K_L	-0.275	30.927	

Intrinsic parameters determination and model validation

The mathematical model was integrated using SIMULINK and Parameter Estimation of the MATLAB, which allow us to perform simulations and the accurate intrinsic parameters determination, which are shown in Table 1, together with apparent constants for the partially

purified and purified enzyme. As it can be observed, some parameters were significantly changed. The intrinsic constants K_{gs}, V_{mk}, K_{mk}, K_{gk}, V_{mn}, K_{mn}, K_{gn} decreased, both for the partially and purified enzyme. These parameters have decisive influence upon kinetics of production of G, GF_2 e GF_3 . The intrinsic constants V_{ms} , V_{mnh} , K_{mnh} also decreased for the both the partially and purified enzyme, and their influence is more prominent in the kinetics of consumption of GF and in the formation of F. The intrinsic values of V_{ms} e K_{sn} were further modified in order to improve model fitting. Additionally, it has been noticed during simulations that the mass transfer coefficient (K_{I}) has significant influence upon kinetics in general, especially related to the consumption of GF, and should also be tuned for better fitting: its value changed from 1×10^{-2} m h⁻¹ to 1.03×10^{-4} m h⁻¹, 100 times lower than the initially determined through experimental data. By comparing the kinetic parameters from Table 1, practically all of them changed, some substantially, in spite of the results of the parametric sensitivity that pointed out that, some could remain practically unchanged. This can be explained by the fact that the output variable for SF calculation was the total concentration of FOS at the end of the process, which may not represent the real changes in the kinetics of reaction. Another output variable, for instance the correlation coefficient for each curve, might have been more adequate and provided more suitable results. However, and in spite of this, the final result was quite acceptable in terms of the model fitting.

Table 3 shows the model prediction and experimental data related to the FOS produced in 96 hours, in which it can be observed deviations lower than 5% for the total FOS production, for both enzymes, although deviations for FOS species are in some cases quite higher, because the fitting parameter method that was used, as explained before. For the purified enzyme, however, there was a better fitting, with deviations around 3.5%. The results showed that the predicted data are similar to the experimental ones, with correlation coefficient, R, higher than 0.92 for the partially purified enzyme and higher than 0.93 for the purified enzyme. Fig. 3 and 4 depict the model validation, by comparing model predictions with experimental data, for sucrose concentrations of 70 %.

One can say that the predictions of the mathematical model give a good description of sucrose uptake and FOS production by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Under conditions of 50°C and pH of 4.5, the results can be considered satisfactory, showing that mathematical modeling is a robust and reliable tool for predictions and design of FOS production processes, either with purified or partially purified fructosyltransferase.



Figure 3. Model validation: model predictions (lines) and experimental data (symbols), for 500 g L⁻¹ sucrose (50°C, pH 4.5, 5 U_I mL⁻¹) using (A) partially purified immobilized enzyme and (B) purified fructosyltransferase immobilized enzyme. Bars indicate the standard deviations.



Figure 4. Model validation: model predictions (lines) and experimental data (symbols), for 700 g L⁻¹ sucrose (50°C, pH 4.5, 5 U_i mL⁻¹) using (A) partially purified immobilized enzyme and (B) purified fructosyltransferase immobilized enzyme. Bars indicate the standard deviations.

Prediction and your found on the second seco							
	Exper	imental		Model predictions			
	PPE	PE	PPE	RED _{ppe}	PE	RED _{pe}	
50 % GF							
GF ₂	34.07±0.4	33.92±1.8	34.42	1.03	34.99	3.15	
GF_3	7.26±0.9	9.01±1.7	9.56	31.68	10.02	11.20	
GF_4	3.16±0.4	3.40 ± 1.4	2.33	26.27	2.92	14.12	
FOS	44.49±0.7	46.33±1.8	46.31	4.09	47.93	3.45	
70 % GF							
GF_2	33.98±0.7	33.52±1.3	33.21	2.27	34.96	4.29	
GF_3	7.18±1.4	9.16±1.3	7.25	0.97	9.06	1.09	
GF_4	3.17±0.9	2.36±0.8	1.72	45.74	2.34	0.85	
FOS	44.33±1.0	45.04±1.1	42.18	4.85	46.36	2.93	
PPE, partially purified enzyme; PE, purified enzyme.							
GF ₂ , 1-kestose; GF ₃ , nystose; GF ₄ , fructosylnystose.							
RED, Relative error deviation between experimental data and model predictions, (%).							

Table 3. FOS production (%): comparation between experimental data and model prediction after 96 hours of reaction.

CONCLUSION

The immobilized fructosyltransferase in support of niobium were provided yields of around 46% from sucrose concentration of 50% and 70% (w/v), after 96 hours of synthesis. The kinetic study revealed inhibitory effects by sucrose at concentrations above 60% and competitive inhibition by glucose over sucrose, 1-kestose e nystose uptakes. The dynamic mathematical modeling included mass balance at the interface solid-liquid and kinetic equations. The determination of the kinetic equations for immobilized enzymes included intrinsic parameter fittings from the experimental apparent constants. The mass transfer between liquid and solid phases was shown to be significant, since the mass transfer coefficient, K_L, influences the courses of the synthesis reaction. The mathematical model fitted well the experimental data, either for purified or partially purified enzyme. The purified enzyme was, nevertheless, the most efficient, what has been reflected by the kinetic parameters. However, there was no significant difference in FOS production, with both enzyme purification grade, which was robustly predicted by the model. Therefore, the mathematical model can be used for both conditions of immobilized enzyme, and can be considered predictive and a valid instrument for design of a bioreactor for FOS production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP).

REFERENCES

 Passos LML and Park YK, Fructooligosaccharides: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural* 33: 385-390 (2003).

- Cheng CY, Duan KJ, Sheu DC, Lin CT and Li SY, Production of fructooligosaccharides by immobilized Mycelium of Aspergillus japonicus. J Chem Technol Biotecnhol 66: 135-138 (1996).
- Cruz R, Cruz VD, Belini MZ, Belote JG and Vieira CR, Production of fructooligosaccharides by the myeclia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. *Biosou. Technol* 65: 139-143 (1998).
- Ghazi I, De Segura AG, Fernandez-Arrojo L, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, Plou F and Ballesteros A, Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. *J Mol Catal B: Enzym* 35: 19-27 (2005).
- Hayashi S, Kinoshita J, Nonoguchi M, Takasaki Y and Imada K, Continuous production of 1kestose by β-fructofuranosidase immobilized on Shirasu porous glass. *Biotechnol Lett* 13: 395-398 (1991).
- 6. Tanriseven A and Aslan Y, Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* **36**: 550-554 (2005).
- Platová Z, Polakovič M, Štefuca V, Vandáková M and Antošová M, Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. *Chem Pap* 60: 469-472 (2006).
- 8. Chien CS, Lee WC and Lin TJ, Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. *Enzyme Microb Tecnhol* **29**: 252-257 (2001).
- Aguiar-Oliveira E. Imobilização da enzima fructosyltransferase de *Rhodotorula* sp. e aplicação na produção de fructooligosaccharides, Msc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineer, Brazil (2007).
- 10. Dutta R, Immobilized enzyme, in: Fundamentals of Biochemical Engineering (Hardcover) Spinger, pp 50-69 (2008).

111

- 11. Duan KJ, Chen JS and Sheu DC, Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb Technol* **6**: 334-339 (1994).
- Jung KH, Yun JW, Kang KR and Lim JY, Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb Technol* 11: 491-494 (1989).
- Hernalsteens S and Maugeri F, Purification and characterization of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 589-596 (2008).
- 14. Mendes GL, Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo de batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados. Msc. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineer, Brazil (2006).
- Maugeri F and Aguiar-Oliveira E, Método para imobilização de enzimas utilizando suporte sólido inorgânico. Brazilian Patent PI 070683-1 (2007).
- 16. Somogyi MA, A new reagent for the determination of sugar. J Biol Chem 160: 61-68 (1945).
- Nelson N, Aphotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J Biol Chem 153: 375-380 (1944).
- Chen WC and Lui CH, Production of β-fructofuranosidase by Aspergillus japonicus. Enzyme Microb Technol 18: 153-160 (1996).
- Levins D and Glastonbury J, Particle-Liquid Hydrodynamics and Mass transfer in a Stirred Vessel Part II – Mass Transfer. *Trans Inst Chem Eng* 50: 132-146 (1972).
- 20. Rushton JH, Costich EW and Everett HJ, Power characteristics of mixing impeller I and II. *Chem Eng Prog* **46**: 395-467 (1950).
- 21. Hidaka H, Hirayama M and Sumi NA, Fructooligosaccharides-producing enzyme from *Aspegillus niger* ATCC 20611. *Agricultural Biol Chem* **52**: 1181-1187 (1988).

- 22. Su YC, Sheu CS, Chien YY and Tzan TK, Production of β-fructofuranosidase with transfructosylating activity for fructooligosaccharides synthesis by *Aspergillus japonicus* NTU-1249. *Life Sci* **15**: 131-139 (1991).
- 23. Park YK and Almeida MM, Production of fructooligosaccharides from sucrose by transfructosylase from *Aspergillus niger*. *Word J Microbiol Biotechnol* **7**: 331-334 (1991).
- 24. Aguiar-Oliveira E and Maugeri F, Characterization of the Immobilized Fructosyltranferase from Rhodotorula sp. Int J Food Eng 6(3): Article 9. DOI: 10.2202/1556-3758.1894 Available at: <u>http://www.bepress.com/ijfe/vol6/iss3/art9</u>
- 25. Chaplin MF and Bucke C, Enzyme Tecnhology; Cambridge University Press; 264pp (1990).
- Woodward J. in: Immobilized cells and enzymes: a practical approach; IRL Press; Washington, 175pp (1985).
- Burket CAV, Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeolitas.
 Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculty of Food Engineer, Brazil (2003).

ARTIGO 3:

MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA OPERANDO EM REATOR DE CESTO EM BATELADA

Modelagem, simulação e otimização da produção de frutooligossacarídeos pela enzima frutosiltransferase imobilizada operando em reator de cesto em batelada

Mónica B. Alvarado-Huallanco, Francisco Maugeri Filho Departamento de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Bioprocessos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas P.O. Box 6121 – 13083-862- Campinas – SP, Brasil.

Correspondência do autor

Tel.: +19 3521 4052 Fax: +19 3521 4027 *e-mail*: <u>maugeri@fea.unicamp.br</u> (F. Maugeri).

Resumo

Modelagem e simulação da produção de frutooligossacarídeos por frutosiltransferase, imobilizada em suporte inorgânico de nióbio, aplicada em um reator de cesto, foram estudadas visando a otimização do processo. As ferramentas computacionais utilizadas foram os programas Simulink do software MatLab 6.0, MathWork, Inc, USA. Os dados cinéticos do processo foram obtidos utilizando frutosiltransferase purificada, produzida por *Rhodotula* sp. Os experimentos de otimização foram realizados por simulação, segundo dois delineamentos do tipo composto central rotacional (DCCR). No primeiro delineamento determinaram-se as variáveis com maior influência, e no segundo otimizaram-se as condições para a produção de FOS. As condições ótimas foram para a atividade de enzima imobilizada em nióbio de 14 U_i/mL e uma velocidade de rotação de 45 rpm. Nestas condições o rendimento de FOS foi de 50,6% após 24 horas de síntese nas condições de 50°C e pH 4,5. Os resultados mostram que o coeficiente de transferência de massa teve influência significativa no curso da reação e na produção de FOS. Palavra chave: Frutosiltransferase; *Rhodotorula* sp.; frutooligossacarídeos; enzima imobilizada, reator de cesto batelada, modelagem matemática, simulação e otimização de processos.

1 INTRODUÇÃO

A enzima frutosiltransferase é utilizada na produção de frutooligossacarídeos (FOS), considerados como prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium bifidus*, promovendo uma serie de benefícios à saúde [1].

As enzimas imobilizadas apresentam algumas mudanças nas suas propriedades físicas e químicas, após o processo de imobilização. Em geral, as enzimas imobilizadas comparadas com as enzimas livres têm melhor estabilidade térmica e em relação ao pH, são fáceis de separar e podem ser reutilizadas ou usadas continuamente. A eficiência da imobilização depende das propriedades do suporte, natureza da enzima e condições de imobilização [2]. As propriedades cinéticas das enzimas são alteradas com o processo de imobilização devido às modificações conformacionais que a molécula da enzima sofre em seu sitio ativo. Porém, a sua expressão depende da velocidade com que o substrato difunde no sistema, indo da solução até atingir o sítio ativo no interior da partícula do catalisador. Nesse trajeto são gerados gradientes de concentração do substrato cuja intensidade depende dos mecanismos de transferência. Em geral a escolha do suporte, do meio e dos parâmetros de operação reduzem estes efeitos [3]. Estudos realizados por Aguiar-Oliveira & maugeri [4] para imobilizar a enzima frutosiltransferase imobilizada em um suporte a base de nióbio apresentaram resultados promissores. Observou-se, após a imobilização, um deslocamento do perfil de atividade enzimática para uma região mais básica, quando comparada com a enzima livre. Este comportamento é explicado pela carga negativa do suporte. Além do pH ótimo (4,5) para a enzima livre, observou-se ótima atividade e estabilidade em pH 6,0.

Artigo 3

Os reatores descontínuos são os mais utilizados nos processos com a enzima em solução, onde a enzima é introduzida no reator junto ao substrato, sendo descartada, quando o processo é finalizado. Isto não acontece com a enzima imobilizada, pois esta pode ser reutilizada várias vezes, processo este limitado somente pela perda gradual da atividade catalítica da enzima. No entanto, quando a enzima imobilizada é utilizada em reator com agitação, geralmente o contato com as pás do agitador provoca perdas de partículas de catalisador, bem como a desativação parcial da enzima imobilizada. Ainda neste tipo de reator, alguns suportes podem sofrer perdas devido ao atrito com o agitador. Para superar ou minimizar estas dificuldades, existem alguns recursos entre os quais o reator de cesto, que evita o contato direto da partícula com o agitador, pois o catalisador fica retido dentro do cesto.

Duan *et al.* [5], de acordo com os estudos realizados por Jung *et al.* [6], propuseram o mecanismo de reação da enzima envolvida na produção de frutooligossacarídeos. Indicaram que a formação de frutooligossacarídeos ocorre segundo um conjunto consecutivo de reações, $GF_n + GF_n$ $\rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$. Alvarado-Huallanco & Maugeri [7] reportaram um estudo cinético da atividade de frutosiltransferase imobilizada em suporte inorgânico de nióbio, utilizando um reator de mistura, aonde o efeito de transferência de massa na superfície do suporte foi incluído no modelo matemático, observando-se a influência significativa do coeficiente de transferência de massa externo, K_L , no curso da reação de síntese. A imobilização da frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp. em nióbio mostrou-se ser tecnicamente viável, por apresentar bons rendimentos e o biocatalizador ser formado por uma enzima estável e um suporte robusto, de baixo custo e reutilizável.

A modelagem matemática e simulação são utilizadas como ferramentas no desenvolvimento tecnológico, prevendo o comportamento dinâmico e estacionário do bioprocesso, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando assim a determinação das condições operacionais ótimas do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de parâmetros de controle. No entanto, a simulação do processo corresponde à sua análise e otimização, através de modelos

matemáticos [8]. Este trabalho tem como objetivo a modelagem, simulação e otimização a produção de FOS a partir da enzima frutosiltransferase imobilizada no suporte de nióbio utilizando um reator de cesto (RC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação do coeficiente de transferência de massa

Utilizou-se um reator de cesto (RC) de acordo as dimensões padrão, definidas por Roushton [9], com diâmetro do reator (D_t) de 6,5 cm, altura (H) de 6,5 cm e volume do tanque (V_r) de 200 cm³, no qual foi introduzido um sistema de 4 defletores com largura de 0,65 cm e inclinados 45°. O cesto é um cilindro de diâmetro (d) de 0,8 cm e altura (h) de 5 cm, constituído por uma malha 90 mesh de aço inoxidável fixada ao reator. A agitação foi feita por um agitador contendo 6 pás, sendo o diâmetro destas (D_i) de 2,17 cm e altura (w) de 0,54 cm. O reator foi operado a 50°C com uma solução de sacarose 50% em tampão acetato de sódio (50mM, pH 4,5) e com diferentes velocidades de agitação, segundo o ensaio realizado.

Para a determinação do coeficiente de transferência de massa (K_L) no reator de cesto, utilizou-se a correlação expressa pela a equação 1, de acordo com Teshima e Ohashi [10] relacionando o número de Sherwood à dissipação de energia (ϵ), ao número de Schmidt e às relações geométricas do reator. Um dos parâmetros nesta equação, a energia dissipada (ϵ), é determinada a partir da equação 2. No entanto, para cálculo de ϵ necessita-se da potência do rotor (P), sendo considerado o valor determinado previamente por Alvarado-Huallanco [7] para um reator de mistura.

$$Sh = \frac{K_L d_p}{D(s)} = 2 + 0.012 \left[\frac{\varepsilon d_p^{-4}}{v^3} \right]^{0.41} \left[\frac{\nu}{D(s)} \right]^{0.64}$$
(1)

$$\mathcal{E} = \frac{P}{V \cdot \rho} \tag{2}$$

$$Np = \frac{P}{\rho_L N^3 D^5} \tag{3}$$

A difusividade do substrato em solução foi determinada pela equação de Stoke-Einstein (Eq. 4), que é utilizada na avaliação de difusão em líquidos, onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, μ é a viscosidade do solvente e R_o é o raio do soluto. Neste caso, o substrato considerado foi a sacarose, cujo R_0 é igual a 4,4x10⁻⁸ cm [4]. O diâmetro da matriz do suporte, d_p , é de 0,0177 cm [4] e K_B , constante de Boltzmann, igual a 1,38x10⁻¹⁶ g.cm²/K.s².

$$D(s) = \frac{K_B \cdot T}{6\pi \cdot \mu \cdot R_o} \tag{4}$$

2.2 Determinação do rendimento e produtividade

O cálculo do rendimento para os FOS na síntese foi determinado pela equação 5.

$$Y_{FOS} = \frac{[FOS]}{[GF_0]} \tag{5}$$

Para a determinação da composição de FOS utilizou-se a equação 6, onde n varia de 2 a 4 para kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutosilnistose (GF_4), respectivamente.

$$\phi \ GF_n = \frac{\left[GF_n\right]}{\left[GF_0\right]} \tag{6}$$

Para o cálculo dos produtos residuais foi utilizada a equação 7, onde C é G para a glicose, F para a frutose e GF para a sacarose.

$$\phi C = \frac{[C]}{[GF_0]} \tag{7}$$

Para a determinação da produtividade de FOS na síntese utilizou-se a equação 8.

$$\Pr = \frac{\left[FOS\right]}{t} \tag{8}$$

2.3 Modelo matemático

De acordo as equações propostas por Duan et al. [5] e Jung et al. [6] para a síntese temos:

 $2 \text{ GF} \to \text{GF}_2 + \text{G} \tag{9}$

$$2 \operatorname{GF}_2 \to \operatorname{GF}_3 + \operatorname{GF} \tag{10}$$

$$2 \operatorname{GF}_3 \to \operatorname{GF}_4 + \operatorname{GF}_2 \tag{11}$$

$$GF_3 \rightarrow GF_2 + F$$
 (12)

Segundo estudos realizados por Alvarado-Huallanco & Maugeri [7], utilizando o reator de mistura e a enzima frutosiltransferase extracelular produzida por *Rhodotorula* sp., imobilizada em suporte formado de uma liga de grafite e nióbio, foi comprovado a existência de inibição competitiva pela glicose para a reação de transfrutosilação tendo sacarose, 1-kestose e nistose como substratos. Para o reator de cesto, foi construído um modelo matemático com base em balanços de massa dinâmicos para substrato e produtos, nas fases líquida e sólida, considerando-se somente a reação na superfície, sem difusão intra-particular, devido à baixa porosidade das partículas, segundo estudos realizados por Aguiar-Oliveira & Maugeri [4]. O modelo matemático compreende as equações 13 a 18 para a fase líquida e 19 a 24 para a fase sólida.

$$\frac{dGF_m}{dt} = -K_L \left(GF_m - GF_s \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) \right)$$
(13)

$$\frac{dG_m}{dt} = K_L \left(G_s \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - G_m \right)$$
(14)

Artigo 3

$$\frac{dGF_{2m}}{dt} = K_L \left(GF_{2s} \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{2m} \right)$$
(15)

$$\frac{dGF_{3m}}{dt} = K_L \left(GF_{3s} \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{3m} \right)$$
(16)

$$\frac{dGF_{4m}}{dt} = K_L \left(GF_{4s} \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{4m} \right)$$
(17)

$$\frac{dF_m}{dt} = K_L \left(F_s \cdot \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - F_m \right)$$
(18)

$$\frac{dGF_s}{dt} = K_L \left(GF_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) - GF_s \right) - \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}} \right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}} \right)}$$

$$+\frac{342}{2\times504}\frac{V_{mk}\times GF_{2s}}{GF_{2s}+K_{mk}\left(1+\frac{G_s}{K_{gk}}\right)}$$
(19)

$$\frac{dG_s}{dt} = -K_L \left(G_s - G_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}} \right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}} \right)}$$
(20)

$$\frac{dGF_{2s}}{dt} = -K_L \left(GF_{2s} - GF_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) - \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}} \right)}$$

$$+\frac{504}{2\times342}\frac{V_{ms}\times GF_s}{GF_s\left(1+\frac{GF_s}{K_{ss}}\right)+K_{ms}\left(1+\frac{G_s}{K_{gs}}\right)}+\frac{504}{2\times666}\frac{V_{mn}\times GF_{3s}}{GF_{3s}+K_{mn}\left(1+\frac{G_s}{K_{gn}}\right)}$$
504 V : × GF_

$$+\frac{504}{666}\frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s}\left(1+\frac{GF_{3s}}{K_{snh}}\right)+K_{mnh}}$$
(21)

123

$$\frac{dGF_{3s}}{dt} = -K_L \left(GF_{3s} - GF_{3m} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) - \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gn}} \right)} - \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{snh}} \right) + K_{mnh}} + \frac{666}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}} \right)}$$
(22)

$$\frac{dGF_{4s}}{dt} = -K_L \left(GF_{4s} - GF_{4m} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{828}{2 \times 666} \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gn}} \right)}$$
(23)

$$\frac{dF_s}{dt} = -K_L \left(F_s - F_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{180}{666} \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{sn}} \right) + K_{mnh}}$$
(24)

O valor do coeficiente de difusividade da sacarose em solução foi obtido pela equação 4, sendo este último igual a 3,06 x 10^{-7} m h⁻¹. Para a determinação do coeficiente de transferência de massa externa, K_L, para o reator de cesto foi utilizada a equação 1, como descrito em 2.1. Na Tabela 1 mostra-se os valores das constantes cinéticas utilizadas no reator de mistura, determinados anteriormente por Alvarado-Huallanco & Maugeri [7]. A fração de sólidos dentro do reator foi calculada de acordo com a quantidade de massa do biocatalisador adicionada, segundo a atividade enzimática almejada.

substratos.					
	GF		GF_2		
V_{ms}	32,56	V_{mk}	38,53		
K _{ms}	263,73	K _{mk}	287,96		
K _{gs}	23,61	\mathbf{K}_{gk}	14,23		
K _{ss}	615,10				
GF_3^{a}		GF ₃ ^b			
V _{mn}	9.10	V_{mnh}	9.07		
\mathbf{K}_{mn}	380.00	$\mathbf{K}_{\mathrm{mnh}}$	269.32		
\mathbf{K}_{gn}	31.60	K _{sn}	30.60		
Dados de Alvarado-Huallanco & Maugeri [7].					

Tabela 1. Parâmetros cinéticos intrinsicos para a frutosiltransferase purificada para diferentes

 V_{m} (g/L.h), K_{m} , K_{i} (g/L).

GF, sacarose; GF₂, 1-kestose; GF₃, nistose.

^aReação de transfrutosilação com nistose como substrato.

^bReação de hidrolise com nistose como substrato.

2.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com o objetivo de determinar as condições ótimas para a produção de FOS em um reator do tipo cesto e baseado na metodologia experimental descrita por Rodrigues e Iemma (2005) [11], foram realizados dois planejamentos experimentais do tipo composto central rotacional (DCCR), de dois fatores, com um ponto central, totalizando 5 experimentos $(2^2 + 1)$ sendo os resultados obtidos por simulação. No primeiro DCCR (Tabela 2) foram avaliadas as variáveis mais importantes no processo e no segundo DCCR (Tabela 2) foram otimizadas as condições de síntese para a produção de FOS. As variáveis independentes selecionadas foram a concentração do biocatalisador, E, (U_i/mL) e a velocidade de agitação, N (rpm), pois ambos fatores afetam a reação de síntese, sendo o primeiro relativo à velocidade de reação e o segundo relativo à velocidade de transferência de massa. Foram considerados como variáveis de resposta (variáveis dependentes) a conversão de FOS, Y_{FOS}, produtividade, Pr, composição dos FOS para GF₂, GF₃ e GF₄ e composição residual para GF, G e F nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, totalizando 8 variáveis respostas, em 4 tempos diferentes. As matrizes dos delineamentos experimentais contendo os níveis codificados e valores reais para cada experimento realizado estão representadas nas Tabelas 2.

	Variável independente					
Ensaios	1 D	OCCR	2DCCR			
	X_1	X_2	\mathbf{X}_1	X_2		
1	16(-1)	220(-1)	9,0(-1)	48(-1)		
2	44(1)	220(-1)	19,0(1)	48(-1)		
3	16(-1)	820(1)	9,0(-1)	92(1)		
4	44(1)	820(1)	19,0(1)	92(1)		
5	10(-1,41)	520(0)	6,9(-1,41)	70(0)		
6	50(1,41)	520(0)	21,1(1,41)	70(0)		
7	30(0)	100(-1,41)	14,0(0)	39(-1,41)		
8	30(0)	940(1,41)	14,0(0)	101(1,41)		
9	30(0)	520(0)	14,0(0)	70(0)		

Tabela 2. Níveis originais das variáveis independentes do primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) 2⁴, para estudo das condições ótimas de síntese de FOS.

X₁: Atividade enzimática [U_i/mL]

X₂: Agitação [rpm]

2.5 Análise estatística

A análise estatística permitiu avaliar as variáveis importantes do processo, em diferentes níveis, e em combinações entre si. Assim, para analise dos DCCRs foram consideradas as variáveis rendimento de FOS e produtividade, para isso foi considerado um nível de significância de 5% (p<0,05), de acordo com Rodrigues e Iemma (2005) [11], nas análises destes resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Os ensaios foram realizados por simulações do modelo matemático (equações 12 a 23) utilizando o programa do SIMULINK do MATLAB. Os valores das constantes cinéticas utilizadas estão mostrados na Tabela 1, já anteriormente determinados para o reator de mistura [7]. Para avaliar as variáveis do processo de síntese de FOS foi realizado um primeiro DCCR, cujos valores são mostrados na Tabela 2. As variáveis estudadas foram a concentração de enzima (E) e a velocidade de rotação (N) que exerce influência sobre o valor do coeficiente de transferência de massa, K_L de acordo com as equação 1 a 3.

Na Tabela 3 e 4 são mostrados os resultados do primeiro DCCR, para o rendimento de obtenção de FOS e produtividade para os períodos de 18, 24 e 30 h de síntese. Pode-se observar que todos os tempos analisados promovem um aumento ou diminuição de Y_{FOS} , diminuição de GF_2 , aumento de GF_3 e GF_4 , G e F. Em geral, observou-se que o consumo de GF é maior nas primeiras 48 horas e logo este consumo diminui gradativamente, tornando-se a concentração praticamente estável ao final da reação.

Para maiores velocidades de rotação, o Y_{FOS} aumenta com o tempo, porém os valores obtidos foram baixos. No entanto, para baixas velocidades de rotação o Y_{FOS} é maior nas primeiras 24 horas, diminuindo com o decorrer do tempo. Portanto, uma maior velocidade de agitação, o que implica um maior coeficiente de transferência de massa, desfavorece a formação de FOS, o que pode ser explicado pelo aumento da transferência de moléculas do FOS da superfície do biocatalisador para o meio de reação, diminuindo, portanto o contato entre estas moléculas e o biocatalisador. Em todos os casos, a maior produtividade foi obtida nas primeiras 24 horas, diminuindo consideravelmente após 48 horas. No caso do GF₂, este diminui com o tempo devido sua utilização para a síntese de GF₃, e em seguida GF₄. Para G e F, na maioria dos casos, teve-se um aumento contínuo no decorrer do tempo, como pode-se observar na Figura 1.

Os melhores Y_{FOS} encontram-se entre as 18 e 24 h de síntese. No entanto, a maior produtividade foi obtida para um tempo de reação de 18 h. Se compararmos a diferença de Y_{FOS} entre os dois períodos, pode-se observar um aumento no rendimento ao redor de 3% para 24 h de síntese. Porém, em relação à produtividade, há uma perda ao redor do 26% neste período. Na Figura 1 pode-se observar que a produção máxima de FOS se dá às 24 h de síntese, e a partir desse período tem-se uma queda no Y_{FOS} . Para avaliar o Y_{FOS} e Pr foi considerado um tempo de reação de 24 h como ótimo.

Dentre os ensaios realizados (Tabela 3 e 4), para um período de síntese de 24 h, alguns deles destacaram-se e serão analisados separadamente. Os ensaios 3, 4, e 8 com maiores velocidades de rotação logo nas primeiras 24 horas de síntese apresentaram os menores valores de Y_{FOS} (37,58 a 37,59%) e produtividade (7,83 a 8,27 g/L.h), com diminuição de seus valores após 48 horas de síntese, atingindo valores de 45% e 4,69 g/L.h, respectivamente. Por outro lado, os ensaios 1 e 7, com menores velocidades de rotação, alcançaram maiores valores de Y_{FOS} (47,99 e 49,11%) e produtividade (10,0 e 10,23 g/L.h). Para GF₂, a menor produção foi para o ensaio 3 (22,17%), refletidos nos resultados finais. Os ensaios 2, 4 e 6 apresentaram menor produção de FOS, o que indicaria que a frutose não necessariamente foi convertida em novos componentes (GF₂, GF₃ e GF₄), apesar de haver um maior nível de atividade enzimática, observando-se ainda maior liberação de glicose, assim como menor consumo de GF, (Tabela 4). O ensaio 7 foi o que forneceu os melhores resultados para Y_{FOS} e produtividade, e menores componentes residuais após 24 horas de síntese (Tabela 3).
		GF ₂ (%)		GF ₃ (%)	(GF ₄ (%)		Y _{FOS} (%	6)]	FOS (g/L	.)	F	Pr (g/Lł	ı)
Ensaio	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h
1	25,7	23,5	22,5	19,1	20,7	21,1	2,6	3,8	4,4	47,4	48,0	48,0	237,1	240,2	240,0	13,2	10,9	10,0
2	28,3	27,1	26,4	15,0	16,4	16,9	1,9	2,6	3,0	45,1	46,2	46,3	225,5	230,8	231,7	12,5	10,5	9,7
3	22,2	20,6	19,9	15,4	16,1	16,1	2,4	3,3	3,7	40,0	39,9	39,7	199,8	199,4	198,6	11,1	9,1	8,3
4	23,7	22,7	22,2	12,0	12,7	12,8	1,7	2,3	2,6	37,4	37,6	37,6	187,0	188,0	187,9	10,4	8,5	7,8
5	22,9	20,7	19,6	18,4	19,4	19,5	2,8	3,9	4,5	44,1	44,0	43,7	220,4	220,0	218,6	12,2	10,0	9,1
6	26,0	24,9	24,3	12,7	13,6	13,9	1,7	2,3	2,6	40,3	40,8	40,8	201,7	204,0	203,9	11,2	9,3	8,5
7	28,2	26,8	25,9	17,3	19,0	19,6	2,2	3,1	3,6	47,7	48,9	49,1	238,6	244,5	245,6	13,3	11,1	10,2
8	22,6	21,5	21,1	12,9	13,5	13,7	1,9	2,6	2,9	37,5	37,6	37,6	187,3	187,9	188,0	10,4	8,5	7,8
9	24,9	23,3	22,4	15,3	16,3	16,6	2,6	3,0	3,4	42,4	42,6	42,4	211,9	213,0	212,2	11,8	9,7	8,8

Tabela 3. Respostas de conversão de FOS para o primeiro delineamento composto central rotacional DCCR.

Tabela 4. Resposta de produtos residuais para o primeiro delineamento composto central rotacional DCCR.

	1	G		1 1	F		1	GE	
Ensaios		U			1			U	
Liisaios	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h
1	28,0	31,0	32,4	1,8	2,6	3,0	22,8	18,3	16,6
2	25,5	28,4	29,7	1,5	2,2	2,5	27,9	23,3	21,5
3	32,2	35,5	36,8	1,6	2,2	2,5	26,2	22,4	21,0
4	28,9	32,0	33,2	1,3	1,8	2,0	32,4	28,6	27,2
5	31,2	34,8	36,3	1,8	2,6	3,0	22,9	18,6	17,0
6	26,9	30,0	31,4	1,4	2,0	2,2	31,4	27,2	25,6
7	25,6	28,4	29,5	1,6	2,4	2,8	25,0	20,4	18,6
8	30,8	33,7	34,9	1,4	1,9	2,1	30,4	26,8	25,5
9	29,1	32,4	33,9	1,6	2,2	2,6	27,0	22,7	21,1



Figura 1. Produção de FOS utilizando a frutosiltransferase para o reator de cesto em batelada (50°C, pH 4,5, 50% de sacarose e 30 U_i/mL de enzima).

A Figura 1, tomada como exemplo do processo, referente ao ensaio 7 (Tabela 3 e 4), mostra os resultados de síntese de FOS, onde se pode observar que a concentração de FOS se acumula durante o tempo reação, assim como glicose, frutose, nistose e frutosilnistose, ao passo que a sacarose é gradualmente consumida, até atingir um nível mínimo. Há, no entanto, sempre um resíduo de sacarose no final da reação, além dos outros açúcares liberados no processo.

Na tabela 5 pode-se observar o efeito das variaveis em estudo, sendo que todas as variáveis de primeira ordem mostraram efeito negativo para o rendimento de FOS (Y_{FOS}) e produtividade (Pr). Assim, para os maiores níveis de concentração de enzima e agitação têm-se menores rendimentos e produtividades. Resultados apresentados em negrito são os que possuem maior significância estatística, sendo, portanto os que apresentaram maior influência nas respostas.

	Y	FOS]	Pr
Fator	Efeito	р	Efeito	р
Média	42,45	< 0,0001	8,84	< 0,0001
(1)E (L)	-2,00	0,0006	-0,42	0,0006
E (Q)	-0,13	0,5954	-0,03	0,5756
(2)N (L)	-8,35	< 0,0001	-1,74	< 0,0001
N (Q)	0,95	0,0224	0,20	0,0219
1L vs 2L	-0,24	0,2972	-0,05	0,3342

Tabela 5. Estimativa do efeito para a produção de FOS e produtividade para 24 h de síntese.

Números em negrito são variáveis significativas a 95% de confiança: p<0,05

No que concerne aos resultados do primeiro delineamento, na Tabela 6 mostram-se os resultados da ANOVA para Y_{FOS} e produtividade, considerando apenas as variáveis com maior influência. O F calculado foi maior que o F tabelado a 95% de confiança para Y_{FOS} e produtividade, permitindo a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 2.

Tabela 6. ANOVA para rendimento de	e FOS (g/L) e produtividade (g/L.h) para o primeiro
	DCCR.

Fonte de	Soma quadr	dos ados	Grau liber	us de dade	Quadrado	o médio	F	alc
variação	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr
Regressão	148,1932	6,5085	3	3	49,3977	2,1695		
Residual	0,1734	0,0204	5	5	0,0347	0,0041	1423	531
Total	148,3666	6,5289	8	8				

FOS: $R^2 = 99,88$; $F_{3,5;0,05} = 9,01$ Pr: $R^2 = 99,68$; $F_{3,5;0,05} = 9,01$

Na Figura 2 mostra que os rendimentos mais altos são obtidos quando há, principalmente, baixa velocidade de rotação, menor que 100 rpm, e também com baixas atividades biocatalíticas, menores que 25 U_i/mL. Nestas condições, tanto o rendimento quanto a produtividade são maximizadas, ao redor de 49% e 10,23 g/L.h, respectivamente.



Figura 2. Superfícies de resposta para o primeiro DCCR mostrando o efeito da concentração da enzima (E) e velocidade de rotação (N) na síntese de FOS após 24 horas de reação:
(a) rendimento de FOS (b) produtividade.

		GF ₂ (%)		GF ₃ (%)	(GF ₄ (%)		Y_{FOS} (%	b)	I	FOS (g/L	.)	F	Pr (g/Lh	l)
Ensaio	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h
1	25,5	23,2	22,1	21,3	23,2	23,7	2,9	4,2	4,9	49,8	50,7	50,7	249,0	253,4	253,7	13,8	11,5	10,6
2	27,3	25,4	24,4	19,3	21,2	21,7	2,5	3,6	4,2	49,1	50,2	50,4	245,4	250,9	251,8	13,6	11,4	10,5
3	25,3	23,0	21,8	21,2	23,0	23,5	2,9	4,2	4,9	49,4	50,2	50,2	247,0	250,8	250,9	13,7	11,4	10,5
4	27,0	25,1	24,1	19,2	21,0	21,5	2,5	3,6	4,2	48,7	49,7	49,8	243,3	248,3	248,9	13,5	11,3	10,4
5	25,0	22,6	21,4	21,7	23,6	24,1	3,0	4,4	5,1	49,8	50,5	50,5	248,8	252,6	252,7	13,8	11,5	10,5
6	27,4	25,6	24,7	18,9	20,7	21,3	2,4	3,5	4,1	48,7	49,8	50,0	243,7	249,1	249,9	13,5	11,3	10,4
7	26,5	24,5	23,4	20,3	22,2	22,7	2,7	3,9	4,5	49,5	50,5	50,7	247,7	252,7	253,3	13,8	11,5	10,6
8	26,2	24,0	23,0	20,1	21,9	22,4	2,7	3,9	4,5	48,9	49,8	49,9	244,7	249,0	249,4	13,6	11,3	10,4
9	26,4	24,3	23,2	20,2	22,0	22,6	2,7	3,9	4,5	49,3	50,2	50,3	249,0	250,9	251,4	13,7	11,4	10,5

Tabela 7. Respostas de conversão de FOS para o segundo delineamento composto central rotacional DCCR.

Tabela 8. Resposta de produtos residuais para o segundo delineamento composto central rotacional DCCR.

E		G			F			GF	
Ensaios	18h	22h	24h	18h	22h	24h	18h	22h	24h
1	27,1	29,8	31,0	1,9	2,8	3,2	21,1	16,7	15,0
2	26,2	28,8	30,0	1,8	2,6	3,0	22,9	18,4	16,7
3	27,5	30,3	31,5	1,9	2,8	3,2	21,2	16,8	15,1
4	26,5	29,3	30,5	1,8	2,6	3,0	23,0	18,5	16,7
5	27,5	30,3	31,5	2,0	2,8	3,3	20,8	16,4	14,7
6	26,2	28,9	30,0	1,7	2,5	3,0	23,3	18,8	17,0
7	26,6	29,2	30,4	1,8	2,7	3,1	22,0	17,6	15,8
8	27,1	29,9	31,1	1,8	2,7	3,1	22,1	17,7	15,9
9	26,8	29,5	30,7	1,8	2,7	3,1	22,1	17,6	15,9

Para o segundo DCCR, a Tabela 2 mostra as variáveis independentes, com os valores codificados e reais, e a seqüência dos ensaios. Na Tabela 7 e 8 mostram-se os resultados para os diferentes ensaios. Assim os ensaios 1, 5 e 7 destacaram-se pela maior produtividade e rendimento. Os ensaios 2, 4 e 6 proporcionaram menores resíduos de GF, G e F, porém menores porcentagens de FOS e menores produtividades. A análise estatística indicou a atividade enzimática e a agitação como sendo as variáveis com maior influência no processo de síntese de FOS, a 95% de confiança (p<0,05). Os resultados obedeceram à mesma tendência verificada no primeiro planejamento como mostra a Tabela 9, com melhores produções em baixas atividades enzimáticas e baixas velocidades de agitação.

Tabela 9. Estimativa do efeito para a produção de FOS e produtividade para o segundo DCCR para

	Y	FOS	F	r
Fator	Efeito	р	Efeito	р
Média	50,29	< 0,0001	10,48	< 0,0001
(1)E(L)	-0,39	< 0,0001	-0,0850	< 0,0001
E (Q)	-0,03	0,0041	-0,0100	0,0329
(2)N (L)	-0,56	< 0,0001	-0,1177	< 0,0001
N (Q)	-0,02	0,0132	-0,0050	0,1575
1L vs 2L	-0,01	0,0532	-0,0050	0,1149

Números em negrito são variáveis significativas a 95% de confiança: p<0,05

Os resultados da ANOVA para o segundo DCCR são mostrados na Tabela 10, para rendimento de FOS e produtividade, considerando apenas os termos com maior influência. Sendo que o F calculado foi maior que o F tabelado a 95% de confiança para Y_{FOS} e produtividade, permitindo a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 3. Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 1ª ordem para as variáveis codificadas. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos.

 $Y_{FOS} = 50,2754 - 0.1992.E - 0,2818.N$

Pr = 10,4763 - 0.0425.E - 0,05889.N

Tabela 10. ANOVA para rendimento de FOS	(g/L) e produtividade (g/L.h) para o 2 DCCR.
---	--

Fonta da	Soma de o	Soma de quadrado			Quadrac	F _{calc}		
variação	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr
Regressão	0,9507	0,0421	3	3	0,3169	0,0140		
Residual	0,0004	0,0001	5	5	0,00008	0,00001	3772	1170
Total	0,9512	0,0422	8	8				

FOS: $R^2 = 99,95$; $F_{3,5;0,05} = 9,01$ Pr: $R^2 = 99,86$; $F_{3,5;0,05} = 9,01$

Na Figura 3 estão mostrados os resultados, em forma de superfícies de resposta, do segundo DCCR, para Y_{FOS} e produtividade, para 24 horas de reação. Como se pode observar, os valores ótimos foram para baixas atividades enzimáticas, menores que 15 U_i/mL, e baixas velocidades de

rotação, abaixo de 50 rpm.



Figura 3. Superfícies de resposta para o segundo DCCR, mostrando o efeito da concentração da enzima (E) e velocidade de rotação (N) na síntese de FOS após 24 h: (a) rendimento de FOS, (b) produtividade.

Em face disso, foi realizada uma nova simulação para uma concentração de enzima de 14 U_i/mL e velocidade de rotação de 45 rpm, sendo que o valor determinado para o coeficiente de transferência de massa, K_L , foi de 3,87 x 10⁻³ m/h. Os resultados, ilustrados pela Figura 4, forneceram uma concentração máxima de FOS ao redor de 253,0 g/L, correspondendo a um rendimento de aproximadamente 50,60% de Y_{FOS} e produtividade de 10,54 g/L.h, após 24 h de síntese, para uma concentração inicial de sacarose de 50% (p/v). Estes resultados correspondem ao máximo obtido neste processo, indicando que a otimização foi bem sucedida. A composição final do produto foi ao redor de 23,36% de GF₂, 22,76% de GF₃ e 4,52% de GF₄, e componentes residuais de 30,45% de G, 3,12% de F e 15,84% de GF.



Figura 4. Resultados da produção de FOS após a otimização do processo (50°C, pH 4,5, 50% de sacarose e 14 U_i/mL de enzima).

Na Tabela 11 são comparadas as produções de FOS em diferentes tipos de reatores, para a enzima livre [11], enzima imobilizada em reator de batelada [7] e reator de cesto do presente trabalho. Observa-se que os valores de FOS para a enzima livre (56,87%) são maiores do que os obtidos no reator de cesto (50,60%). Entretanto, para o reator de mistura com a enzima imobilizada, observa-se uma menor produção de FOS (47,93%). Em relação à produtividade, pode-se observar que o reator de cesto foi mais eficiente, atingindo uma produtividade de 10,54 g/L.h, sendo que para os outros reatores a produtividade foi menor que 3 g/L.h. Isto demonstra a eficiência do reator de cesto em batelada, em relação aos demais, embora seu rendimento seja um pouco inferior ao reator com enzima livre. Porém, o fato de poder-se reutilizar a enzima por longos períodos dá ampla vantagem ao reator de cesto.

	RN	ЛL	RI	MI	RO	СВ
	Y_{FOS} (%)	Pr (g/Lh)	Y_{FOS} (%)	Pr (g/Lh)	Y_{FOS} (%)	Pr (g/Lh)
GF ₂	23,35	1,22	34,99	1,82	23,36	7,36
GF ₃	24,77	1,29	10,02	0,52	22,76	5,64
GF_4	8,75	0,46	2,92	0,15	4,52	0,75
Total FOS	56,87	2,97	47,93	2,50	50,60	10,54

Tabela 11. Produção de FOS (%) utilizando a frutosiltransferase para diferentes reatores.

RML, reator de mistura enzima livre (96 h), Alvarado-Huallanco & Maugeri [12].

RMI, reator de mistura enzima imobilizada (96 h), Alvarado-Huallanco & Maugeri [7].

RCB, reator de cesto (24 h).

GF₂, 1-kestose; GF₃, nystose; GF₄, fructosylnystose; Pr, produtividade.

Comparando-se os resultados com a literatura, o reator de cesto teve resultados similares para a produção de FOS (50,60%). Assim, resultados obtidos por Aguiar-Oliveira & Maugeri [4], trabalhando experimentalmente com a síntese de FOS em reator batelada, forneceram um rendimento na produção de FOS de 57,8%, GF₂ (61%), GF₃ (34,7%) e GF₄ (4,7%), para um tempo de reação de 24 h, utilizando 20 U₄/ml de enzima imobilizada (pH 6,0 e 48°C). Outros autores alcançaram concentrações entre 55 e 61% de FOS, como Cheng *et al.* [13], que utilizou o *A. japonicus* imobilizado em gel de alginato de cálcio, em leito fixo, a 42°C, com reação continua por 35 dias, com uma perda do 17% na atividade da enzima durante este período, e rendimento de produção de FOS maior que 55%. Hidaka *et al.* [14] e Su *et al.* [15] obtiveram máxima conversão de 60% após 24 horas. O micélio do *A. japonicus*, imobilizado em alginato de cálcio em pH 5,0-5,6 e temperatura de 55°C, após 4 horas de síntese, rendeu uma produção máxima de 61% de FOS com frações de GF₂, 30,5%, GF₃, 26,5%, GF₄, 4,3% e G de 29%, resultados estes obtidos por Cruz *et al.* [16]. Ghazi *et al.* [17], utilizando o *A. aculeatus* imobilizado em epóxi ativada, em reatores operando em batelada, e em leito fixo, obtiveram 61,5% de FOS após 36 horas de reação a 60°C, 38,0% de GF₂, 22,0% de GF₃ e 0,48% de GF₄.

138

4. CONCLUSÃO

O estudo da otimização do processo de síntese mostrou que a concentração de enzima e a velocidade de rotação foram variáveis com maior influência na síntese de FOS. O coeficiente transferência de massa, dependente da velocidade de rotação, influencia significativamente a reação de síntese para a produção de FOS. Utilizando um reator de cesto a partir da enzima frutosiltransferase imobilizada em nióbio, foi obtido rendimentos de 50,60% para concentrações de sacarose de 50% (p/v), após 24h de síntese. O modelo matemático utilizado descreveu satisfatoriamente o comportamento do processo de síntese. O reator de cesto mostrou-se vantajoso, pois proporciona rendimentos compatíveis com os reportados na literatura, maiores produtividades, com as características do biocatalisador não ter contato direto com o agitador, evitando a perda prematura da atividade catalítica, e de permitir sua reutilização, diminuindo assim o custo de operação.

NOMENCLATURA

	d	diâmetro	do	cesto do	catalisador ((m
--	---	----------	----	----------	---------------	----

- d_p diâmetro da partícula do biocatalizador (m)
- D_i diâmetro da pa (m)
- D_(s) coeficiente de difusividade do soluto em solvente (m/h)
- D_t diâmetro do reator (m)
- F concentração de frutose (g/L)
- G concentração de glicose (g/L)
- GF concentração de sacarose (g/L)
- GF₂ concentração de 1-kestose (g/L)
- GF₃ concentração de nistose (g/L)
- GF₄ concentração de frutosilnistose (g/L)

- h altura da cesta do catalisador (cm)
- H altura do liquido (cm)
- K_B constante de Boltzmann
- K_{gk} constante de inibição competitiva pela glicose para a 1-kestose como substrato (g/L)
- K_{gs} constante de inibição competitiva pela glicose para a sacarose como substrato (g/L)
- K_{gn} constante de inibição competitiva pela glicose para a nistose como substrato (g/L)
- K_L coeficiente de transferência de massa (m/h)
- K_m constante de saturação (g/L)
- K_{mk} constante de saturação para a 1-kestose (g/L)
- K_{mnh} constante de saturação para a nistose pela atividade hidrolítica (g/L)
- K_{ms} constante de saturação para a sacarose (g/L)
- K_{mn} constante de saturação para a nistose (g/L)
- K_{snh} constante de inibição pela a atividade hidrolítica para nistose como substrato (g/L)
- K_{ss} constante de inibição para sacarose como substrato (g/L)
- m_s massa do sólido (g)
- R_o raio do soluto (m)
- P potencia do rotor (Kg.m)
- Sh numero de Sherwood
- T temperatura de reação (K)
- V_L volume do liquido (L)
- V_{mk} velocidade máxima da atividade de transfrutosilação para a 1-kestose como substrato (g/L.h)
- V_{mn} velocidade máxima da atividade de transfrutosilação para a nistose como substrato (g/L.h)
- V_{mnh} velocidade máxima da atividade hidrolítica para a nistose como substrato (g/L.h)
- V_{ms} velocidade máxima para a sacarose como substrato (g/L.h)

 V_T volume liquido do reator (L)

V_s volume do sólido (L)

Gregos

α	fração líquida
8	taxa de energia de dissipação por unidade de massa (m²/s)
μ	viscosidade da sacarose (g/m.h)
ν	viscosidade cinemática da sacarose (g/m.h)
ρ	densidade da sacarose (g/m^3)
ρ_{s}	densidade do sólido (g/m ³)

Subindice

m meio

s superfície da partícula do biocatalizador

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

 Passos L.M.L., Park Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos; Ciência Rural, 33 (2003) 385.

- 2. Chien C.S., Lee W.C., Lin T.J. Immobilization of Aspergillus japonicus by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. Enzyme Microb. Tecnhol. 29 (2001) 252.
- 3. Dutta R. in: Fundamentals of biochemical engineering (Hardcover) Spinger, 2008.
- Aguiar-Oliveira E. and Maugeri F. Characterization of the Immobilized Fructosyltranferase from Rhodotorula sp. Int J Food Eng 6(3): Article 9. DOI: 10.2202/1556-3758.1894 Available at: <u>http://www.bepress.com/ijfe/vol6/iss3/art9</u>
- 5. Duan K.J., Chen J.S., Sheu D.C. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. Enzyme Microb. Technol. 16 (1994) 334.
- Jung K.H., Yun J.W., Kang K.R., Lim J.Y. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. Enzyme Microb. Technol. 11 (1989) 491.
- Alvarado-Huallanco M.B., Maugeri F. Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from a new microorganism *Rhodotorula* sp. on inorganic support. J Chem Technol Biotechnol 85 (2010).
- Borzani W., Aquarone E., Lima U.A., Schimidell W. in: Biotecnhologia industrial, Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.
- Rushton JH, Costich EW and Everett HJ, Power characteristics of mixing impeller I and II. Chem Eng Prog 46: 395-467 (1950).
- Theshima H., Ohashi Y. Particle to liquid mass transfer in a rotating catalyst basket reactor. J Chem. Eng. Japan. 10 (1977) 70.
- Rodrigues M.I., Iemma A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos; Casa do Lago Editora; Campinas-SP, 2005.
- Alvarado-Huallanco M.B., Maugeri F. Kinetic studies and modeling of the production of fructooligosaccharide by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Chemical Product and Process Modeling (em andamento).

- 13. Cheng C.Y., Duan K.J., Sheu D.C., Lin C.T., Li S.Y. Production of fructooligosaccharides by immobilized Mycelium of *Aspergillus japonicus*. J. Chem. Technol. Biotecnhol. 66 (1996) 13.
- Hidaka H., Hirayama M., Sumi N.A. Fructooligosaccharides-producing enzyme from *Aspegillus niger* ATCC 20611. Agricultural Biol Chem. 52 (1988) 1181.
- Su Y.C., Sheu C.S., Chien Y.Y., Tzan T.K. Production of β-fructofuranosidase with transfructosylating activity for fructooligosaccharides synthesis by Aspergillus japonicus NTU-1249. Life Sci. 15 (1991) 131.
- Cruz R., Cruz V.D., Belini M.Z., Belote J.G., Vieira C.R. Production of fructooligosaccharides by the myeclia of Aspergillus japonicus immobilized in calcium alginate. Biosour. Technol. 65 (1998) 139.
- Ghazi I., De Segura A.G., Fernandez-Arrojo L., Alcalde M., Yates M., Rojas-Cervantes M.L., Plou F., Ballesteros A. Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. J. Mol. Catal. B: Enzym. 35 (2005) 19.

ARTIGO 4:

MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE REATOR DE CESTO CONTINUO PARA A PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR FRUTOSILTRANSFERASE IMOBILIZADA

Modelagem, simulação e otimização de reator de cesto continuo para a produção de frutooligossacarídeos por frutosiltransferase imobilizada

Mónica B. Alvarado-Huallanco, Francisco Maugeri Filho

Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas Campinas – SP, Brasil.

Correspondência do autor: maugeri@fea.unicamp.br

Resumo

Estudos de modelagem e simulação representam ferramentas poderosas, economizando tempo e recursos para o desenvolvimento de bioprocessos. Assim, vários estudos de modelagem, simulação e produção de frutooligossacarídeos, a partir de sacarose, com frutosiltransferase de *Rhodotorula* sp., vem sendo realizados ultimamente. Neste trabalho, a modelagem dinâmica do processo de síntese em bioreator de cesto contínuo foi realizada, partindo de balanços de massa e cinética de reação, contemplando igualmente os fenômenos de resistência à transferência de massa. As ferramentas computacionais utilizadas foram os programas Simulink do software MatLab 6.0, MathWork, Inc, USA. O modelo obtido, juntamente com a simulação do processo, foram utilizados na otimização da produção contínua de frutooligossacarídeos pela frutosiltransferase, em suporte inorgânico. Para tanto, realizou-se dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), sendo que no primeiro foram determinadas variáveis com maior influência, e no segundo otimizaram-se as condições de síntese. As condições ótimas obtidas foram: 15 Ui/mL de atividade biocatalítica e velocidade de rotação de 45 rpm. As outras condições de processo, como pH, temperatura e concentração de substrato foram as mesmas obtidas em trabalhos prévios. Assim, nas condições ótimas o rendimento de FOS foi cerca de 32% e produtividade de 5.0 g/L.h, com tempo

de residência de 32 h, uma concentração de sacarose na alimentação de 50% sacarose, 50°C de temperatura e pH 4,5. Os resultados mostraram que para o reator continuo o produto principal de FOS foi o GF_4 , cerca de 25% do total, resultado este muito diferente dos obtidos por outros tipos de reatores. Finalmente, atividade biocatalítica e o coeficiente de transferência de massa tiveram influência significativa no curso da reação e no rendimento de produção de FOS.

Palavra chave: Frutosiltransferase; *Rhodotorula* sp.; frutooligossacarídeos; enzima imobilizada, reator de cesto continuo, modelagem matemática, simulação e otimização de processo.

1 INTRODUÇÃO

A produção de frutooligossacarídeos (FOS) nos últimos anos tem-se incrementado. Os FOS são considerados prebióticos uma vez que promovem seletivamente o crescimento de microorganismos probióticos como *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium bifidus*, promovendo uma serie de benefícios à saúde [1]. A enzima frutosiltransferase é utilizada na produção de FOS, algumas técnicas de imobilização da enzima foram estudadas visando otimizar a produção e aumentar o tempo de vida útil da enzima. A imobilização apresenta algumas mudanças nas propriedades físicas e químicas das enzimas após o processo de imobilização. Assim, estudos realizados por Aguiar-Oliveira & Maugeri [2] para imobilizar a enzima frutosiltransferase imobilizada em um suporte a base de nióbio apresentaram ótimos resultados. Observaram um deslocamento para uma faixa mais básica de pH em seu perfil após a imobilização. Além do pH ótimo (4,5) para a enzima livre, observou-se ótima atividade e estabilidade em pH 6,0. Este comportamento pode ser explicado pela carga negativa do suporte.

Estudos realizados por Duan *et al.* [3] e Jung *et al.* [4], propuseram o mecanismo de reação da enzima envolvida na produção de frutooligossacarídeos, indicaram que a formação de

frutooligossacarídeos ocorre de um conjunto consecutivo de reações, $GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$. Alvarado-Huallanco & Maugeri [5] realizou o estudo cinético para a atividade frutosiltransferase imobilizada em suporte inorgânico de nióbio utilizando um reator de batelada, o efeito de transferência de massa na superfície do suporte que foi incluído no modelo matemático, e observouse a influência significativa de K_L no curso da reação de síntese. A modelagem matemática e simulação permitem prever o comportamento dinâmico e estacionário do bioprocesso, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando assim a determinação das condições operacionais ótimas do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de parâmetros de controle [6]. O principal objetivo deste trabalho foi a modelagem, simulação e otimização da produção de FOS a partir de sacarose, utilizando-se a enzima frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp. imobilizada no suporte sólido, constituído de uma liga de nióbio e grafite, em biorreator tipo cesto, operado continuamente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação do coeficiente de transferência de massa

Utilizou-se um reator de cesto (RC) de acordo as dimensões padrão, segundo Rushton [7], com diâmetro (D_t) de 6,5 cm, altura de líquido (H) de 6,5 cm e volume do tanque (V_r) de 200 cm³, no qual foi introduzido um sistema de 4 defletores com largura de 0,65 cm e inclinados 45°. O cesto é um cilindro de diâmetro (d) de 0,8 cm e altura (h) de 5 cm, constituído por uma malha de 90 mesh de aço inoxidável fixada ao reator. A agitação foi feita por um agitador contendo 6 pás, de (D_i) 2,17 cm e largura (w) de 0,54 cm. O reator foi operado a 50°C com uma solução de sacarose 50% em tampão acetato de sódio (50mM, pH 4,5), sendo a a agitação variada de acordo com o ensaio em estudo. Para a determinação do coeficiente de transferência de massa (K_L) no reator de cesto, utilizou-se a correlação expressa pela a equação 1, de acordo com Teshima e Ohashi [8] relacionando o número de Sherwood ao coeficiente de dissipação de energia (ϵ), ao número de Schmidt e às relações geométricas do reator. Um dos parâmetros nesta equação, a energia dissipada (ϵ), foi determinada a partir da equação 2. No entanto, para cálculo de ϵ necessita-se da potência do rotor (P) (Eq. 3), sendo considerado o valor determinado previamente por Alvarado-Huallanco & Maugeri [5] para um reator de mistura.

$$Sh = \frac{K_L d_p}{D(s)} = 2 + 0.012 \left[\frac{\varepsilon d_p^{-4}}{v^3} \right]^{0.41} \left[\frac{v}{D(s)} \right]^{0.64}$$
(1)

$$\varepsilon = \frac{P}{V \cdot \rho} \tag{2}$$

$$Np = \frac{P}{\rho_L N^3 D^5} \tag{3}$$

A difusividade do substrato em solução foi determinada pela equação de Stoke-Einstein (equação 4), que é utilizada na avaliação de difusão em líquidos, onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, μ é a viscosidade do solvente e R_o é o raio do soluto. Neste caso, o substrato considerado foi a sacarose, cujo R₀ é igual a 4,4x10⁻⁸ cm [2], ρ è de 1,1984 g/cm³, ν é de 0,0668 g/cm.s. O diâmetro da matriz do suporte, d_{p.} é de 0,0177 cm [2] e K_B, constante de Boltzmann, igual a 1,38x10⁻¹⁶ g.cm²/K.s².

$$D(s) = \frac{K_B T}{6\pi . \mu . R_o}$$
⁽⁴⁾

2.2 Determinação do rendimento e produtividade

Para o cálculo do rendimento de FOS na síntese foi determinado pela equação 5, onde GF⁰ é a concentração inicial de sacarose.

$$Y_{FOS} = \frac{\left[FOS\right]}{\left[GF^{0}\right]} \tag{5}$$

Para a determinação da composição de FOS utilizou-se a equação 6, onde n varia de 2 a 4 para kestose, nistose e frutosilnistose, respectivamente.

$$\phi \ GF_n = \frac{\left[GF_n\right]}{\left[GF^0\right]} \tag{6}$$

Para o cálculo dos produtos residuais foi utilizada a equação 7, onde C é para glicose, frutose e sacarose, respectivamente.

$$\phi C = \frac{\left[C\right]}{\left[GF^{0}\right]} \tag{7}$$

Para a determinação da produtividade de FOS na síntese utilizou-se a equação 8, onde D é a diluição dada pela equação 9, Q é fluxo na alimentação e V é o volume do reator.

$$\Pr = [FOS] \cdot D \tag{8}$$

$$D = \frac{Q}{V} \tag{9}$$

2.3 Modelo matemático

De acordo as equações propostas por Duan et al. [3] e Jung et al. [4] para a síntese temos:

$$2 \operatorname{GF} \to \operatorname{GF}_2 + \operatorname{G} \tag{10}$$

$$2 \operatorname{GF}_2 \to \operatorname{GF}_3 + \operatorname{GF} \tag{11}$$

$$2 \operatorname{GF}_3 \to \operatorname{GF}_4 + \operatorname{GF}_2 \tag{12}$$

$$GF_3 \to GF_2 + F \tag{13}$$

A partir do estudo realizado por Alvarado-Huallanco & Maugeri [9], para o reator de cesto utilizando a enzima frutosiltransferase extracelular pura imobilizada em nióbio, produzida pela *Rhodotorula* sp., o modelo descrito foi modificado para a produção continua de FOS.

O comportamento dinâmico de um reator contínuo bifásico, perfeitamente agitado, como do tipo CSTR, pode ser expresso pela equação 14, para fase líquida e sólida:

$$\frac{dC_{im}}{dt} = \frac{(C_{i0} - C_{im})}{\tau} - \frac{K_L}{V} (C_{im} - C_{is})$$

$$\frac{dC_{is}}{dt} = K_L (C_{is} - C_{im}) - r_c$$
(14)

onde, C_{i0} é a concentração do componente i na alimentação, C_{im} e C_{is} são as concentrações do componente i na fase líquida e sólida, respectivamente, K_L é a constante de transferência de massa no filme líquido, τ é a vazão de alimentação, V é o volume do reator, e r_C é a taxa de reação na superfície da partícula.

Os parâmetros cinéticos utilizados (Tabela 1) foram os determinados para reator de mistura [5]. A fração de sólidos no reator variou de acordo com a quantidade de biocatalizador adicionada ao meio reacional. Os valores foram recalculados para cada ensaio para as diferentes concentrações de enzima, segundo o valor da densidade das partículas [2].

	GF		GF ₂
V_{ms}	32,56	\mathbf{V}_{mk}	38,53
\mathbf{K}_{ms}	263,73	$\mathbf{K}_{\mathbf{mk}}$	287,96
K _{gs}	23,61	\mathbf{K}_{gk}	14,23
K _{ss}	615,10		
	$\mathrm{GF_3}^\mathrm{a}$	($\mathrm{GF}_3^{\mathrm{b}}$
V _{mn}	9,10	V_{mnh}	9,07
\mathbf{K}_{mn}	380,00	$\mathbf{K}_{\mathrm{mnh}}$	269,32
\mathbf{K}_{gn}	31,60	K _{sn}	30,60

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para a frutosiltransferase purificada para diferentes substratos.

Dados de Alvarado-Huallanco & Maugeri, [5]

 V_m (g/L.h), K_m , K_i (g/L).

GF, sacarose; GF₂, 1-kestose; GF₃, nistose.

^aReação de transfrutosilação com nistose como substrato.

^bReação de hidrolise com nistose como substrato.

2.3 Planejamento experimental

Com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a produção de FOS em um reator do tipo cesto continuo, e baseado na metodologia experimental descrita por Rodrigues e Iemma (2005) [10], utilizando-se o modelo matemático do processo de síntese, foram realizados dois delineamentos tipo composto central rotacional (DCCR), de quatro variáveis, ou seja, do tipo 2^4 , incluindo 8 pontos axiais e 1 ponto central. Sendo os resultados obtidos por simulação, No primeiro DCCR foram avaliadas as variáveis com maior influência e no segundo foram otimizadas as condições de síntese para a produção de FOS. As variáveis independentes selecionadas foram a concentração do biocatalizador, E, a velocidade de agitação, N, tempo de residência, τ , e concentração de sacarose na alimentação, GF₀. Foram considerados como variáveis resposta (variáveis dependentes) o rendimento da produção de FOS, Y_{FOS}, produtividade, Pr, composição dos

Artigo 4

FOS para GF_2 , GF_3 e GF_4 e composição residual para GF, G e F até alcançarem o regime permanente, totalizando 8 variáveis respostas. A matriz do delineamento experimental contendo os níveis codificados para cada experimento realizado está representando na Tabela 2 e 5.

2.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos nos DCCRs para rendimento de FOS e produtividade, permitiu avaliar as variáveis importantes do processo, em diferentes níveis e em combinações entre si. Para o DCCR foi utilizado um nível de significância de 5% (p<0,05), de acordo com Rodrigues e Iemma (2005) [10], para as analises destes resultados.

2.5 Modelagem matemática

O modelo matemático dinâmico foi desenvolvido para a predição em regime transiente das concentrações de substratos e produtos, para um reator de cesto continuo, contendo a enzima frutosiltransferase imobilizada na superfície do suporte de nióbio. A partir do balanço de massa dinâmico para substratos e produtos, cinética da reação e resistência a transferência de massa do meio líquido até a superfície da partícula, construiu-se o modelo matemático do processo, representado pelas equações 15 a 26, contemplando fase líquida e fase sólida.

- fase líquida:

$$\frac{dGF_m}{dt} = \frac{(GF_0 - GF_m)}{\tau} - \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(GF_m - GF_s \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) \right)$$
(15)

$$\frac{dG_m}{dt} = -\frac{G_m}{\tau} + \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(G_s \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - G_m \right)$$
(16)

$$\frac{dGF_{2m}}{dt} = -\frac{GF_{2m}}{\tau} + \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(GF_{2s} \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{2m} \right)$$
(17)

$$\frac{dGF_{3m}}{dt} = -\frac{GF_{3m}}{\tau} + \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(GF_{3s} \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{3m} \right)$$
(18)

$$\frac{dGF_{4m}}{dt} = -\frac{GF_{4m}}{\tau} + \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(GF_{4s} \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - GF_{4m} \right)$$
(19)

$$\frac{dF_m}{dt} = -\frac{F_m}{\tau} + \frac{K_L}{V_T \cdot \alpha} \left(F_s \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right) - F_m \right)$$
(20)

-fase sólida:

$$\frac{dGF_s}{dt} = K_L \left(GF_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) - GF_s \right) - \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}} \right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}} \right)} + \frac{342}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}} \right)}$$

$$(21)$$

$$\frac{dG_s}{dt} = -K_L \left(G_s - G_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{V_{ms} \times GF_s}{GF_s \left(1 + \frac{GF_s}{K_{ss}} \right) + K_{ms} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gs}} \right)}$$
(22)

$$\frac{dGF_{2s}}{dt} = -K_L \left(GF_{2s} - GF_{2m} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) - \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gk}} \right)}$$

$$+\frac{504}{2\times342}\frac{V_{ms}\times GF_{s}}{GF_{s}\left(1+\frac{GF_{s}}{K_{ss}}\right)+K_{ms}\left(1+\frac{G_{s}}{K_{gs}}\right)}+\frac{504}{2\times666}\frac{V_{mn}\times GF_{3s}}{GF_{3s}+K_{mn}\left(1+\frac{G_{s}}{K_{gn}}\right)}$$

$$+\frac{504}{666}\frac{V_{mnh}\times GF_{3s}}{GF_{3s}\left(1+\frac{GF_{3s}}{K_{snh}}\right)+K_{mnh}}$$
(23)

$$\frac{dGF_{3s}}{dt} = -K_{L} \left(GF_{3s} - GF_{3m} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) - \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_{s}}{K_{gn}} \right)} - \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{snh}} \right) + K_{mnh}} + \frac{666}{2 \times 504} \frac{V_{mk} \times GF_{2s}}{GF_{2s} + K_{mk} \left(1 + \frac{G_{s}}{K_{gk}} \right)}$$
(24)

$$\frac{dGF_{4s}}{dt} = -K_L \left(GF_{4s} - GF_{4m} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{828}{2 \times 666} \frac{V_{mn} \times GF_{3s}}{GF_{3s} + K_{mn} \left(1 + \frac{G_s}{K_{gn}} \right)}$$
(25)

$$\frac{dF_s}{dt} = -K_L \left(F_s - F_m \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right) + \frac{180}{666} \frac{V_{mnh} \times GF_{3s}}{GF_{3s} \left(1 + \frac{GF_{3s}}{K_{sn}} \right) + K_{mnh}}$$
(26)

O valor do coeficiente de difusividade da sacarose em solução foi obtido pela equação 3, sendo este igual a 3,06 x 10^{-7} m h⁻¹. Para a determinação do coeficiente de transferência de massa externa, K_L, foi utilizada a equação 1, como descrito em 2.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Delineamento Experimental

Os ensaios foram realizados por simulações, usando o modelo matemático (equações 15 a 26) e utilizando o programa SIMULINK do MATLAB. Os valores das constantes cinéticas utilizadas são mostrados na Tabela 1, dados obtidos por Alvarado-Huallanco & Maugeri [5], determinados para o reator de mistura. Para avaliar as variáveis no processo de síntese para a produção de FOS foi realizado um primeiro DCCR, onde os níveis das variáveis independentes são mostrados na Tabela 2. As variáveis estudadas foram a concentração de enzima (E), tempo de residência (τ), a concentração do substrato na alimentação (GF₀) e a velocidade de rotação (N), que influencia o valor do coeficiente de transferência de massa (K_L) como mostra as equações 1 a 3.

Para ilustrar o andamento da reação de síntese de FOS para o reator de cesto contínuo, foi tomado como exemplo os resultados referentes ao ensaio 17 da Tabela 2, para o primeiro delineamento, o que é mostrado na Figura 1. Observa-se nesta figura, que a sacarose foi rapidamente convertida em GF_2 e G, sendo que a máxima produção de GF_2 foi nas primeiras 24 h. Logo, o GF_2 diminui com o tempo sendo convertida em GF_3 e posteriormente transformada em GF_4 . Também, observou-se que o máximo de GF_3 foi ao redor das 30 h de síntese e a partir desse período transformou-se continuamente em GF_4 . Nota-se que o máximo rendimento de FOS foi alcançado no tempo de 24 h, e a partir desse instante, ocorre uma diminuição no rendimento até alcançar o regime permanente. Observa-se que o regime permanente se produz a partir de 160 h de síntese, dependendo das condições de sínteses, sendo obtidos rendimentos ao redor do 29,0%. É importante frisar que o FOS seja composto principalmente por GF_4 (~26%) e com menores quantidades de GF_3 (~2,4%) e GF_2 (~2%), ao contrário dos processos em batelada, em que GF_4 é relativamente baixo. Este resultado pode ser interessante caso se deseje produzir prioritariamente GF_4 , dado suas características prebióticas.



Figura 1. Síntese de FOS a partir da sacarose para um reator de cesto alimentado (50°C, pH 4,5, 50% de sacarose, 15 U_i/mL de enzima).

Para o primeiro DCCR, os níveis das variáveis em estudo são indicados na Tabela 2, juntamente com as respostas obtidas. Analisando as respostas de cada ensaio na Tabela 2, observase a variação da concentração dos vários compostos presentes na síntese de FOS. Assim, para o experimento 2 e 12, pode-se observar uma menor produção de FOS (29,4%) e uma produtividade de 5,7 g/L.h. Observa-se que os maiores rendimentos de FOS (ao redor de 30,4%) foram para os ensaios 13, 17, 22 e 23 com produtividades acima de 6,3 g/L.h.

Na Tabela 3, os resultados apresentados em negrito são os mais os estatisticamente significativos, sendo os que apresentaram maior influência nas respostas. Assim, os resultados mostram que a concentração de enzima e o tempo de residência foram os que mostraram maior influência em relação ao rendimento de FOS e produtividade. Por outro lado, a velocidade de agitação e concentração da enzima tiveram menor influência para os níveis estudados. A estimativa de efeito (Tabela 3) mostrou que as variáveis concentração de enzima e velocidade de agitação tiveram efeito negativo no rendimento de FOS e produtividade. Por outro lado, na Tabela 2 observa-se que para os níveis superiores de enzima houve menores rendimentos de FOS e produtividade, o que indicaria que a frutose não foi necessariamente convertida em novos componentes, apesar de estar presente uma maior atividade enzimática, como se mostra na Tabela 2, observa-se maior produção de GF₂, GF₃, e menor GF4, os produtos residuais de G e GF encontram-se em quantidades maiores. Já a velocidade de agitação, que se relaciona com a velocidade de agitação, tem efeito negativo, e os melhores resultados foram para os níveis de agitação inferiores a 80 rpm. Entretanto, observou-se que para maiores níveis de tempo de residência obteve-se um incremento no rendimento e produtividade de FOS. Por outro lado, a concentração de sacarose na alimentação mostrou resultados ótimos para concentrações acima de 500 g/L.

Ensaios	X_1	X_2	X ₃	\mathbf{X}_4	FOS	$\boldsymbol{Y}_{\text{FOS}}$	Pr	GF_2	GF ₃	GF_4	G	F	GF	Tempo
1	19(-1)	60(-1)	26(-1)	450(-1)	150,3	30,1	5,8	1,9	2,4	25,7	49,4	19,3	1,2	190
2	27(1)	60(-1)	26(-1)	450(-1)	147,2	29,4	5,7	2,6	2,8	24,0	49,4	19,5	1,6	180
3	19(-1)	100(1)	26(-1)	450(-1)	149,3	29,9	5,7	1,9	2,5	25,4	49,9	19,0	1,3	190
4	27(1)	100(1)	26(-1)	450(-1)	147,8	29,6	5,7	2,9	3,2	23,5	48,9	19,2	1,2	180
5	19(-1)	60(-1)	30(1)	450(-1)	153,2	30,6	5,1	2,2	2,9	25,6	48,9	19,2	1,2	180
6	27(1)	60(-1)	30(1)	450(-1)	154,3	30,9	5,1	3,6	4,1	23,2	48,9	19,4	1,7	165
7	19(-1)	100(1)	30(1)	450(-1)	154,3	30,9	5,1	3,6	4,1	23,2	48,4	18,8	1,9	165
8	27(1)	100(1)	30(1)	450(-1)	151,3	30,3	5,0	3,3	3,7	23,2	49,0	18,8	1,9	165
9	19(-1)	60(-1)	26(-1)	550(1)	152,3	30,5	5,9	2,2	2,9	25,3	49,1	19,0	1,4	180
10	27(1)	60(-1)	26(-1)	550(1)	149,5	29,9	5,8	3,0	3,3	23,6	49,0	19,1	1,9	185
11	19(-1)	100(1)	26(-1)	550(1)	149,9	30,0	5,8	2,1	2,7	25,2	49,7	18,8	1,5	190
12	27(1)	100(1)	26(-1)	550(1)	147,2	29,4	5,7	2,9	3,1	23,5	49,6	18,9	2,0	190
13	19(-1)	60(-1)	30(1)	550(1)	155,4	31,1	5,2	2,6	3,4	25,1	48,6	18,9	1,5	170
14	27(1)	60(-1)	30(1)	550(1)	150,9	30,2	5,0	3,1	3,4	23,6	48,7	19,2	1,9	185
15	19(-1)	100(1)	30(1)	550(1)	154,6	30,9	5,2	2,7	3,5	24,8	49,0	18,5	1,6	170
16	27(1)	100(1)	30(1)	550(1)	154,2	30,8	5,1	3,8	4,3	22,7	48,6	18,3	2,3	165
17	15(-2)	80(0)	28(0)	500(0)	152,5	30,5	5,4	1,7	2,4	26,4	49,4	19,0	1,1	190
18	31(2)	80(0)	28(0)	500(0)	146,7	29,3	5,2	3,2	3,2	23,0	49,3	19,3	2,1	195
19	23(0)	40(-2)	28(0)	500(0)	150,1	30,0	5,4	2,3	2,7	25,0	49,0	19,6	1,4	195
20	23(0)	120(2)	28(0)	500(0)	148,5	29,7	5,3	2,5	2,9	24,3	49,8	18,8	1,7	190
21	23(0)	80(0)	24(-2)	500(0)	149,2	29,8	6,2	2,5	3,0	24,3	49,6	18,9	1,7	180
22	23(0)	80(0)	32(2)	500(0)	149,3	29,9	4,7	2,3	2,7	25,0	49,2	19,5	1,5	200
23	23(0)	80(0)	28(0)	400(-2)	150,1	30,0	5,4	2,4	3,0	24,6	49,4	19,2	1,4	180
24	23(0)	80(0)	28(0)	600(2)	149,9	30,0	5,4	2,6	3,0	24,5	49,2	19,1	1,7	180
25	23(0)	80(0)	28(0)	500(0)	149,3	29,9	5,3	2,4	2,8	24,7	49,4	19,2	1,5	190

Tabela 2. Matriz do primeiro DCCR e resultados de produção de FOS e produtividade.

X₁: Atividade enzimática [U_i/mL]. X₃: Tempo de residência [h].

X₂: Agitação [RPM].

X₄: Concentração de sacarose na alimentação (g/L).

	Y	FOS]	Pr
Fator	Efeito	р	Efeito	р
Média	29,85	< 0,0001	5,33	< 0,0001
(1) E(L)	-0,48	0,0349	-0,08	0,0292
E (Q)	0,16	0,5971	0,02	0,6106
(2) N (L)	-0,13	0,5319	-0,02	0,4965
N (Q)	0,13	0,6617	0,02	0,6779
(3) t (L)	0,58	0,0139	-0,67	< 0,0001
$\tau(Q)$	0,12	0,6806	0,07	0,1596
(4) $GF_0(L)$	0,10	0,6192	0,01	0,5971
$GF_0(Q)$	0,19	0,5111	0,03	0,5210
1L vs 2L	0,04	0,8625	0,01	0,8477
1L vs 3L	0,08	0,7318	0,02	0,6309
1L vs 4L	-0,09	0,6964	-0,01	0,6982
2L vs 3L	0,14	0,5598	0,02	0,5249
2L vs 4L	0,01	0,9789	-0,00	0,9701
3L vs 4L	-0,06	0,8134	-0,01	0,7709

Tabela 3. Estimativa do efeito para a produção de FOS e produtividade.

Números em negrito são variáveis significativas a 95% de confiança: p<0,05

Na Tabela 4 mostram-se os resultados da ANOVA para o primeiro DCCR para rendimento de FOS e produtividade. Foram considerandos apenas os termos com maior influência, sendo que o F calculado foi maior que o F tabelado a 95% de confiança para Y_{FOS} e produtividade, permitindo a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 2.

Fonte de variação	Soma quadr	Grau liber	ıs de dade	Quadrac	F _{calc}			
	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr
Regressão	84,9678	2,7550	2	2	42,4839	1,3775	10.6	2 00 1
Residual	68,3916	0,1015	22	22	3,1087	0,0046	13,6	298,1
Total	153,3594	2,8565	24	24				

Tabela 4. ANOVA para rendimento de FOS (g/L) e produtividade (g/L.h) para o primeiro DCCR.

FOS: $R^2 = 55,40$; $F_{2,22;0,05} = 19,45$ Pr: $R^2 = 96,44$; $F_{2,22;0,05} = 19,45$ Através da análise das superfícies de resposta para o rendimento e produção de FOS, Figura 2, verifica-se que a condição ótima para o tempo de residência está entre 29 e 32 h; no caso da concentração da enzima, encontra-se valores ótimos entre 15 e 20 U_i/mL; para a velocidade de agitação e concentração de sacarose na alimentação (GF_0) nota-se melhores resultados para o nível inferior de velocidade de agitação (menor a 80 rpm) e maiores níveis de concentração de sacarose (acima de 500 g/L).



Figura 2. Superfície de resposta para o primeiro DCCR mostrando o efeito da concentração da enzima, E, e tempo de residência, τ , (A) no rendimento de FOS e (B) na produtividade.

Para a otimização da produção de FOS foi realizado um segundo planejamento (DCCR), considerando-se as variáveis concentração de enzima e tempo de residência; no entanto, as variáveis velocidade de agitação e concentração de sacarose foram consideradas novamente, apesar de não terem mostrado influência no primeiro DCCR. Os níveis para este planejamento encontram-se na Tabela 5, junto às respostas obtidas. A Tabela 6 mostra a estimativa de efeitos, onde se verifica que

os resultados indicam que todas as variáveis foram significativas, p<0,05, exceto o efeito linear da concentração de sacarose. A concentração de enzima e velocidade de agitação tiveram efeito negativo, sendo que os maiores níveis resultaram em menor rendimento de FOS. Porém o tempo de residência e a concentração de sacarose mostram efeito é positivo, assim os melhores rendimentos foram obtidos nos níveis superiores destas variáveis. Ao avaliar a produtividade tem-se que maiores tempos de residência resultaram em menor produtividade (Tabela 5). Assim, nesta tabela observa-se que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 7, 9, 13 e 14 com rendimentos de FOS ao redor de 31% e produtividades ao redor de 5 g/L.h.

Os resultados de ANOVA para o segundo DCCR são mostrados na Tabela 7, para rendimento de FOS e produtividade, considerando apenas os termos estatisticamente significativos. Sendo que o F calculado foi maior que o F tabelado a 95% de confiança para Y_{FOS} e produtividade, permitindo a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 3 e 4. Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de 2ª ordem para as variáveis codificadas. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos.

$$Y_{FOS} = 153,645 + 1,0906.E^2 - 0,490.N + 0,674.N^2 + 1,007.\tau + 0,512.\tau^2 + 0,855.GF_0^2$$

$$Pr = 5.12 + 0.036 \cdot E^2 - 0.016 \cdot N + 0.022 \cdot N^2 - 0.140 \cdot \tau + 0.021 \cdot \tau^2 + 0.029 \cdot GF_0^{-2}$$

Ensaios	\mathbf{X}_1 a	$X_2^{\ b}$	X_3 ^c	X_4^{d}	FOS	$\boldsymbol{Y}_{\text{FOS}}$	Pr	GF_2	GF_3	GF_4	G	F	GF	Tempo
1	16,5(-1)	50(-1)	29(-1)	525(-1)	156.8	31,4	5,4	2,4	3,3	25,6	49,0	19,3	1,1	170
2	19,5(1)	50(-1)	29(-1)	525(-1)	155,7	31,1	5,4	2,7	3,5	25,0	49,0	19,4	1,3	170
3	16,5(-1)	70(1)	29(-1)	525(-1)	156,3	31,3	5,4	2,4	3,4	25,5	49,1	19,0	1,2	170
4	19,5(1)	70(1)	29(-1)	525(-1)	155,2	31,0	5,4	2,7	3,5	24,8	49,1	19,1	1,4	170
5	16,5(-1)	50(-1)	31(1)	525(-1)	157,5	31,5	5,1	2,4	3,4	25,7	48,8	19,4	1,1	170
6	19,5(1)	50(-1)	31(1)	525(-1)	158,1	31,6	5,1	3,0	4,0	24,7	48,8	19,4	1,3	160
7	16,5(-1)	70(1)	31(1)	525(-1)	158,7	31,7	5,1	2,7	3,8	25,2	48,9	19,0	1,2	160
8	19,5(1)	70(1)	31(1)	525(-1)	157,7	31,5	5,1	3,0	4,0	24,5	48,9	19,1	1,4	160
9	16,5(-1)	50(-1)	29(-1)	575(1)	158,7	31,7	5,5	2,7	3,8	25,3	48,8	19,1	1,2	160
10	19,5(1)	50(-1)	29(-1)	575(1)	155,9	31,2	5,4	2,7	3,5	24,9	48,8	19,2	1,4	170
11	16,5(-1)	70(1)	29(-1)	575(1)	155,0	31,0	5,3	2,2	3,1	25,7	48,9	18,8	1,3	175
12	19,5(1)	70(1)	29(-1)	575(1)	155,4	31,1	5,4	2,8	3,6	24,7	49,0	19,0	1,5	170
13	16,5(-1)	50(-1)	31(1)	575(1)	159,4	31,9	5,1	2,7	3,8	25,3	48,6	19,2	1,2	160
14	19,5(1)	50(-1)	31(1)	575(1)	158,3	31,7	5,1	3,1	4,0	24,6	48,6	19,2	1,4	160
15	16,5(-1)	70(1)	31(1)	575(1)	157,2	31,4	5,1	2,5	3,5	25,4	48,8	19,0	1,3	165
16	19,5(1)	70(1)	31(1)	575(1)	157,9	31,6	5,1	3,1	4,0	24,4	48,8	19,1	1,5	160
17	15(-2)	60(0)	30(0)	550(0)	157,6	31,5	5,3	2,3	3,3	25,9	49,0	19,2	1,1	170
18	21(2)	60(0)	30(0)	550(0)	157,2	31,4	5,2	3,2	4,0	24,2	48,8	19,2	1,5	160
19	18(0)	40(-2)	30(0)	550(0)	156,9	31,4	5,2	2,6	3,5	25,4	48,8	19,4	1,2	170
20	18(0)	60(2)	30(0)	550(0)	154,5	30,9	5,1	2,4	3,2	25,3	49,0	19,0	1,4	175
21	18(0)	60(0)	28(-2)	550(0)	153,0	30,6	5,5	2,1	2,8	25,7	49,0	19,1	1,3	185
22	18(0)	60(0)	32(2)	550(0)	157,1	31,4	4,9	2,6	3,6	25,2	48,8	19,3	1,2	170
23	18(0)	60(0)	30(0)	500(-2)	156,2	31,2	5,2	2,5	3,4	25,3	48,9	19,2	1,2	170
24	18(0)	60(0)	30(0)	600(2)	156,6	31,3	5,2	2,7	3,5	25,1	48,9	19,2	1,3	170
25	18(0)	60(0)	30(0)	550(0)	153,6	30,7	5,1	2,2	2,9	25,7	49,0	19,3	1,2	185

Tabela 5. Matriz do segundo DCCR e resultados da produção de FOS e produtividade.

X₁: Atividade enzimática [U_i/mL],

X₂: Agitação [RPM].

X₃: Tempo de residência [h]. X₄: Concentração de sacarose na alimentação (g/L).

	Y	FOS	P	r
Fator	Efeito	р	Efeito	р
Média	30,72	0,0000	5,12	0,0000
(1) E(L)	-0,10	0,2000	-0,01	0,1941
E (Q)	0,43	0,0030	0,07	0,0031
(2) N (L)	-0,19	0,0288	-0,03	0,0284
N (Q)	0,26	0,0370	0,04	0,0379
(3) τ(L)	0,40	0,0003	-0,28	0,0000
$\tau(Q)$	0,20	0,0975	0,04	0,0436
(4) $GF_0(L)$	0,04	0,5720	0,01	0,5728
$GF_{0}\left(Q ight)$	0,34	0,0122	0,05	0,0126
1L vs 2L	0,08	0,4143	0,01	0,4023
1L vs 3L	0,09	0,3306	0,01	0,3115
1L vs 4L	-0,00	0,9787	-0,00	0,9773
2L vs 3L	0,08	0,3968	0,01	0,3688
2L vs 4L	-0,16	0,1167	-0,02	0,1189
3L vs 4L	-0,00	0,9371	-0,00	0,9247

Tabela 6. Estimativa dos efeitos na produção de FOS.

Números em negrito são variáveis significativas a 95% de confiança: p<0,05

Tabela 7. ANOVA para rendimento de FOS (g/L) e produtividade (g/L.h) para o 2 DCCR.

Fonte de variação	Soma quadr	u dos ados	Grau liber	ıs de dade	Quadrad	lo médio	F _{calc}	
	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr	FOS	Pr
Regressão	45,4551	1,8182	6	6	7,5759	0,3030	0.6	0.6
Residual	15,7474	0,6299	18	18	0,8749	0,0350	8,6	8,6
Total	61,2026	2,4481	24	24				

FOS: $R^2 = 74,27$; $F_{6, 18; 0,05} = 3,89$ Pr: $R^2 = 74,27$; $F_{6, 18; 0,05} = 3,89$

As Figuras 3 e 4 mostram as superfícies de resposta para o rendimento de FOS e produtividade, onde se observa as condições ótimas para a síntese de FOS para um tempo de residência de 32 h, concentração de enzima ao redor de 15 Ui/mL, velocidade de agitação de 45
rpm, equivalente a um valor de K_L de 3,7 x 10⁻³ m/h, e concentração de sacarose na alimentação de 600 g/L. Sob estas condições foi realizado uma nova simulação, como mostrado na Figura 5, onde observa-se que o inicio do estado permanente se dá a partir de 170 h, sendo que o produto final nestas condições é de 160,6 g/L de FOS e rendimento de 32,1% e uma produtividade de 5,0 g/L.h. A composição final de FOS é de 2,6% de GF₂, 3,8% para o GF₃ e de 25,7% para o GF₄, com composições residuais de 47,9% para a G, 18,6% para a F e 1,4% para GF.



Figura 3. Superfície de resposta para o segundo DCC mostrando o efeito da concentração da enzima, E, o tempo de residência, τ , e velocidade de agitação, N, no rendimento de FOS.



(**C**)

Figura 4. Superfície de resposta para o segundo DCC mostrando o efeito da concentração da enzima, E, o tempo de residência, τ, e velocidade de agitação, N, na produtividade.



Figura 5. Resultados da produção de FOS após a otimização do processo para um reator de cesto contínuo (pH 4,5, 50°C, 50% de sacarose e 15 U_i/mL).

Comparando-se estes resultados com dados da literatura, o rendimento de FOS do reator de cesto continuo (RCC) resulta ser menor ao rendimento obtido em reator de leito fixo com *A. japonicus* imobilizado em gel de alginato de cálcio no qual obtiveram rendimento de 55 % de FOS [11]. Outros estudos mostraram rendimentos ainda maiores, como os observados por Ghazi *et al.* [12] para um reator batch e leito fixo utilizando o *A. aculeatus* imobilizado em bolhas de epóxiativada, onde obtive-se 61,5% de FOS após 36 h de reação a 60°C, sendo GF₂ 38,0%, GF₃ 22,0% e GF₄ 0,48%. Outros autores, com enzima imobilizada em alginato de cálcio alcançaram máxima conversão de 60% de produção de FOS [13, 14]. Resultados obtidos por Cruz *et al.* [15], para o micélio do *A. japonicus* imobilizado em alginato de cálcio, em pH 5,0-5,6 e temperatura de 55°C, após 4 h de síntese, rendeu uma produção máxima de 61% de FOS com rendimentos de GF₂ 30,5%, GF₃ 26,5% GF₄ 4,3%, G de 29%. Por outro lado, estudos realizados por Aguiar-Oliveira & Maugeri [2] que otimizou as condições para enzima frutosiltransferase d *Rhodotorula* sp., a mesma utilizada

neste trabalho, reportou rendimentos de produção de FOS de 57,8%, sendo GF_2 (61%), GF_3 (34,7%) e GF_4 (4,7%), para um tempo de reação de 24 h, utilizando 20 U_i/ml de enzima imobilizada (pH 6,0 e 48°C). Se compararmos com reator de cesto contínuo (RCC), este apresenta 12% a menos na produção de FOS, diferença dada pelas condições de operação, sendo que para o RCC foram de pH 5,0 e 50°C. Por outro lado, Kim *et al* [16] relatam que o produto da reação está composto de 25~30% para GF_2 , 10~15% para GF_3 , 5~10% para GF_4 , incluindo 25~30% de G, e comparando com os resultados obtidos no RCC, observa-se que as composições são similares as descritas por Kim *et al.* [16]. No entanto, no RCC a composição de FOS é diferente dos encontrados na literatura, sendo o principal componente o GF_4 e em menores quantidades o GF_2 e GF_3 , com se observa na Tabela 8.

Na Tabela 8, mostram-se os resultados para as diferentes produções de FOS, utilizando a enzima frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp. na forma livre no reator de batelada (RML) [17], para a enzima imobilizada em reator de batelada (RMI) [5], para a enzima imobilizada em reator de cesto (RCB) [9], comparados com a enzima imobilizada para o reator cesto continuo (RCC), deste trabalho. Como pode ser observado, o menor rendimento de FOS foi de 32,1% para o reator cesto continuo (RCC), e o maior rendimento foi obtido no reator em batelada com a enzima livre (RML), ao redor de 56,87%. Assim, o RMI sofreu uma diminuição no rendimento ao redor do 16% em relação ao RML, o RCC uma diminuição de 36% em comparação com o RCB. Porém, se avaliarmos em relação à produtividade temos que as menores produtividades foram para o RMI (2,50 g/L.h) e RML (2,97 g/L.h), enquanto que o RCB teve uma produtividade de 10,51 g/L.h. A produtividade obtida no RCC foi de 5,0 g/L.h, sendo que os FOS é composto principalmente por GF₄.

	RML		RMI		RCB		RCC	
	Y _{FOS}	Pr						
	(%)	(g/Lh)	(%)	(g/Lh)	(%)	(g/Lh)	(%)	(g/Lh)
GF ₂	23,35	1,22	34,99	1,82	23,36	7,36	2,6	0,4
GF ₃	24,77	1,29	10,02	0,52	22,76	5,64	3,8	0,6
GF_4	8,75	0,46	2,92	0,15	4,52	0,75	27,5	4,0
Total FOS	56,87	2,97	47,93	2,50	50,60	10,54	32,1	5,0

Table 8. FOS production (%) using fructosyltransferase.

RML, reator de mistura enzima livre (96 h), dados de Alvarado-Huallanco & Maugeri [7]. RMI, reator de mistura enzima imobilizada (96 h), dados de Alvarado-Huallanco & Maugeri [5]. RCB, reator de cesto em batelada (24 h), dados de Alvarado-Huallanco & Maugeri [9].

RCC, reator de cesto contínuo (tempo de residência de 32 h).

GF₂, 1-kestose; GF₃, nystose; GF₄, frutosilnistose.

4. CONCLUSÃO

O modelo matemático obtido neste trabalho, através da modelagem dinâmica de reator de cesto contínuo, para a síntese de FOS com a enzima fructosyltransferase da *Rhodotorula* sp. imobilizada em liga de nióbio, mostrou-se confiável, fornecendo resultados robustos e coerentes. Com foi possível predizer o comportamento do reator, em que ficou constatado os baixos rendimentos e produtividades médias, se comparados com dados da literatura. O estudo da otimização, utilizando o modelo e simulação do processo de síntese, utilizando este biocatalizador em reator de cesto contínuo mostrou que a atividade do biocatalisador, a velocidade de agitação, o tempo de residência e a concentração da sacarose na alimentação são variáveis significativas. Foi possível predizer rendimentos de produção de FOS próximos de 32,1% após 160 h de síntese. A composição final de FOS é diferente do que se obtém com a mesma enzima em outros tipos de reatores, já que é majoritariamente constituída por GF₄ e menores quantidade de GF₂ e GF₃. Esta característica é única, se comparado com os dados da literatura, pois a frutosilnistose esta sempre presente em baixas proporções. Considerando-se seu efeito prebiótico, esta característica pode ser vantajosa em relação aos outros processos. Finalmente, a combinação das ferramentas de modelagem, simulação e delineamento experimental mostrou ser útil na predição do

comportamento do biorreator, economizando tempo e investimentos, e pode ser de grande utilidade no cálculo e dimensionamento de biorreatores.

NOMENCLATURA

- d diâmetro do cesto do catalisador (m)
- d_p diâmetro da partícula do biocatalizador (m)
- D_i diâmetro da pa (m)
- $D_{(s)}$ coeficiente de difusividade do soluto em solvente (m²/h)
- D_t diâmetro do reator (m)
- F concentração de frutose (g/L)
- G concentração de glicose (g/L)
- GF concentração de sacarose (g/L)
- GF₀ concentração de sacarose na alimentação (g/L)
- GF₂ concentração de 1-kestose (g/L)
- GF₃ concentração de nistose (g/L)
- GF₄ concentração de frutosilnistose (g/L)
- h altura da cesta do catalisador (cm)
- H altura do liquido (cm)
- K_B constante de Boltzmann
- K_{gk} constante de inibição competitiva pela glicose para a 1-kestose como substrato (g/L)
- K_{gs} constante de inibição competitiva pela glicose para a sacarose como substrato (g/L)
- K_{gn} constante de inibição competitiva pela glicose para a nistose como substrato (g/L)
- K_L coeficiente de transferência de massa (m/h)
- K_m constante de saturação (g/L)
- K_{mk} constante de saturação para a 1-kestose (g/L)

- K_{mnh} constante de saturação para a nistose pela atividade hidrolítica (g/L)
- K_{ms} constante de saturação para a sacarose (g/L)
- K_{mn} constante de saturação para a nistose (g/L)
- K_{snh} constante de inibição pela a atividade hidrolítica para nistose como substrato (g/L)
- K_{ss} constante de inibição para sacarose como substrato (g/L)
- m_s massa do sólido (g)
- R_o raio do soluto (m)
- P potencia dissipada pelas pás do agitador (N)
- Q vazão de alimentação (L/s)
- Sh número de Sherwood
- T temperatura absoluta de reação (K)
- V volume do reator
- V_L volume do liquido (L)
- V_{mk} velocidade máxima da atividade de transfrutosilação para a 1-kestose como substrato (g/L.h)
- V_{mn} velocidade máxima da atividade de transfrutosilação para a nistose como substrato (g/L.h)
- V_{mnh} velocidade máxima da atividade hidrolítica para a nistose como substrato (g/L.h)
- V_{ms} velocidade máxima para a sacarose como substrato (g/L.h)
- V_T volume liquido do reator (L)
- V_s volume do sólido (L)

Gregos

α fração líquida

 ϵ dissipação de energia por unidade de massa (m²/s)

- μ viscosidade (g/m.h)
- v viscosidade cinemática (g/m.h)
- ρ densidade (g/m³)
- $\rho_{\rm S}$ densidade do sólido (g/m³)
- τ tempo de residência (h)

Subindice

m meio		•
in incro	m	meio

s superfície da partícula do biocatalizador

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Passos L.M.L., Park Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos; Ciência Rural, 33 (2003) 385.
- [2] Aguiar-Oliveira E. and Maugeri F. Characterization of the Immobilized Fructosyltranferase from Rhodotorula sp. Int J Food Eng 6(3): Article 9. DOI: 10.2202/1556-3758.1894 Available at: http://www.bepress.com/ijfe/vol6/iss3/art9
- [3] Duan K.J., Chen J.S., Sheu D.C. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. Enzyme Microb. Technol. 16 (1994) 334.
- [4] Jung K.H., Yun J.W., Kang K.R., Lim J.Y. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. Enzyme Microb. Technol. 11 (1989) 491.

- [5] Alvarado-Huallanco M.B., Maugeri F. Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from a new microorganism *Rhodotorula* sp. on inorganic support. J Chem Technol Biotechnol (2010) DOI: 10.1002/jctb.2477.
- [6] Borzani W., Aquarone E., Lima U.A., Schimidell W. in: Biotecnhologia industrial, Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.
- [7] Rushton JH, Costich EW and Everett HJ, Power characteristics of mixing impeller I and II. *Chem Eng Prog* 46: 395-467 (1950).
- [8] Theshima H., Ohashi Y. Particle to liquid mass transfer in a rotating catalyst basket reactor. J Chem. Eng. Japan. 10 (1977) 70.
- [9] Alvarado-Huallanco M.B., Maugeri F. Otimization of the production of fructooligosaccharides using to basket reactor by immobilized fructosyltransferase *Rhodotorula* sp. (ARTIGO 3).
- [10] Rodrigues M.I., Iemma A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos; Casa do Lago Editora; Campinas-SP, 2005.
- [11] Cheng C.Y., Duan K.J., Sheu D.C., Lin C.T., Li S.Y. Production of fructooligosaccharides by immobilized Mycelium of Aspergillus japonicus. J. Chem. Technol. Biotecnhol. 66 (1996) 13.
- [12] Ghazi I., De Segura A.G., Fernandez-Arrojo L., Alcalde M., Yates M., Rojas-Cervantes M.L., Plou F., Ballesteros A. Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. J. Mol. Catal. B: Enzym. 35 (2005) 19.
- [13] Hidaka H., Hirayama M., Sumi N.A. Fructooligosaccharides-producing enzyme from Aspegillus niger ATCC 20611. Agricultural Biol Chem. 52 (1988) 1181.
- [14] Su Y.C., Sheu C.S., Chien Y.Y., Tzan T.K. Production of β-fructofuranosidase with transfructosylating activity for fructooligosaccharides synthesis by Aspergillus japonicus NTU-1249. Life Sci. 15 (1991) 131.

- [15] Cruz R., Cruz V.D., Belini M.Z., Belote J.G., Vieira C.R. Production of fructooligosaccharides by the myeclia of Aspergillus japonicus immobilized in calcium alginate. Biosour. Technol. 65 (1998) 139.
- [16] Alvarado-Huallanco M.B., Maugeri F. Kinetic studies and modeling of the production of fructooligosaccharide by fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Chemical Product and Process Modeling (em avaliação).
- [17] Kim, B.W., CHOI, J.W., YUN, J.W. Selective production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. Biotechnol Lett 20 (1998) 1031.

Conclusões gerais

- Os estudos cinéticos para a enzima na forma livre mostraram uma cinética tipo Michaelis – Menten com inibição pelo substrato (acima de 70%) e inibição competitiva pela glicose, em relação à sacarose. Similarmente, observou-se inibição competitiva pela glicose em relação à kestose e nistose como substratos. Adicionalmente, foi observada a atividade hidrolítica da enzima sobre a nistose. A enzima frutosiltransferase purificada de *Rhodotorula* sp., na forma livre, mostrou rendimentos de produção de FOS ao redor de 57%, após 24 h de síntese, sendo o maior rendimento obtido pela enzima purificada para concentrações de sacarose de 50 e 70%, o que incrementa a hidrolise de GF₃, aumentando assim a produção de frutose, fato este refletido nas constantes cinéticas e no melhor ajuste entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo. O modelo matemático pode ser utilizado tanto para a enzima parcialmente purificada como para a enzima purificada, sendo considerado como preditivo e válido para o dimensionamento de reatores com o emprego da frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp., na forma livre, para a produção de FOS.

- O estudo cinético para a enzima imobilizada em suporte à base de nióbio mostrou existir inibição pelo substrato sacarose para concentrações acima de 60% e inibição competitiva da glicose para sacarose, 1-kestose e nistose. Observou-se também atividade hidrolítica sobre a nistose. O modelo matemático dinâmico incluiu equações de balanço na interface sólido-líquido e equações cinéticas, descrevendo o processo de síntese da produção de FOS a partir da sacarose utilizando a frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp., tendo apresentado um bom ajuste em relação aos dados experimentais. O efeito de transferência de massa na superfície do suporte foi incluído no modelo matemático, e observou-se a influência significativa de K_L (coeficiente de transferência de massa) no juste dos parâmetros cinéticos. A síntese de FOS pela frutosiltransferase imobilizada em nióbio proporcionou rendimentos ao redor do 47%, com concentrações de sacarose em 50 e 70%. Em relação ao rendimento de FOS, o grau de pureza da enzima não mostrou diferença significativa

entre os dois tipos de enzimas, o que foi predito pelo modelo. Assim, o modelo matemático pode ser utilizado para ambas condições de enzima imobilizada, considerado como preditivo e um instrumento valido para o dimensionamento de reatores para a produção de FOS.

- O estudo para do processo de síntese utilizando reator de cesto por intermédio de planejamento experimental mostrou que a concentração de enzima e a velocidade de rotação foram variáveis significativas na síntese de FOS, em nível de 95% de significância (p<0,05). O modelo matemático utilizado descreveu o comportamento do processo de síntese para o reator de cesto pela utilização da frutosiltransferase imobilizada em nióbio, e após a otimização do processo previu-se rendimentos de FOS de 50,60% para concentrações de sacarose de 50% (p/v), após 24 h de síntese. O coeficiente de transferência de massa, no reator de cesto, é dependente da velocidade de rotação, e influencia significativamente a reação de síntese para a produção de FOS.

- No estudo da utilização do reator de cesto contínuo a partir da imobilização da frutosiltransferase da *Rhodotorula* sp. em de nióbio, previu-se baixos rendimentos e baixas produtividades de FOS. O modelo previu rendimentos de produção de FOS próximos de 32% em estado permanente. O tempo necessário para o estabelecimento deste estado permanente levou cerca de 160 h de síntese, sendo que o maior produto da síntese foi o GF₄, o que diferenciou significativamente dos outros reatores, onde GF₄ representou sempre a menor fração. O estudo da otimização, através de modelagem e simulação do processo de síntese, utilizando este biocatalizador em reator de cesto continuo mostrou que a concentração de enzima, tempo de residência, concentração de sacarose na alimentação e a velocidade de agitação são variáveis significativas. O uso da modelagem, simulação e delineamento experimental mostraram grande utilidade e de grande potencial em cálculo, assim como em projeto e dimensionamento de biorreatores.

 Finalmente, pode-se dizer que o reator de cesto em batelada é o mais apropriado para a produção de FOS, alcançando rendimentos ao redor do 50% sendo o mais próximo aos da enzima na forma livre (57%), assim o biocatalizador, utilizando a imobilização da frutosiltransferase da *Rhodotorula*

176

sp. em nióbio mostrou ser tecnicamente viável, por ser um suporte robusto e de baixo custo, reutilizável, tendo o biocatalizador as vantagens de reutilização e uso continuo no processo, sendo assim mais eficiente e economicamente mais viável.

Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar estudos mais aprofundados da recuperação e purificação enzimática, visando a identificação da fração responsável pela síntese dos FOS e sua caracterização bioquímica.

- Apesar dos ótimos resultados obtidos, verificar o modelo matemático para o reator de cesto em batelada e continuo experimentalmente, avaliando a estabilidade operacional.

- Realizar estudos para a obtenção de maiores rendimentos de FOS, retirando glicose do meio, pois está atua como inibidor para a sacarose como para os FOS. Posteriormente realizar a verificação do modelo matemático.