



JULIANA BUENO DA SILVA

**SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA
BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE POR MICRO-
ORGANISMOS OSMOFÍLICOS**

CAMPINAS

2014



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

JULIANA BUENO DA SILVA

**SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA
BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE POR MICRO-
ORGANISMOS OSMOFÍLICOS**

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

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Basso

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA BUENO DA SILVA
E ORIENTADA PELA PROF^A. DR^A. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

iii

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

Si38s Silva, Juliana Bueno da, 1982-
Síntese de fructooligosacarídeos pela biotransformação da sacarose por micro-organismos osmofílicos / Juliana Bueno da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Coorientador: Luiz Carlos Basso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fruto-oligosacarídeos. 2. Micro-organismos. 3. Biotransformação. 4. Prebióticos. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Basso, Luiz Carlos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis of fructooligosaccharides by sucrose biotransformation using osmophilic microorganisms.

Palavras-chave em inglês:

Fructooligosaccharides

Microorganisms

Biotransformation

Prebiotics

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Daniele Souza de Carvalho

Haroldo Yokio Kawaguti

Hélia Harumi Sato

Mário Roberto Maróstica Júnior

Data de defesa: 20-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore - Orientadora
FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Daniele Souza de Carvalho – Membro Titular
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

Dr. Haroldo Yukio Kawaguti – Membro Titular
PESQUISADOR

Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato – Membro Titular
FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior – Membro Titular
FEA/UNICAMP

Dr^a. Ana Elisabeth Cavalcante Fai Buarque de Gusmão – Membro Suplente
UNIRIO

Dr^a. Ana Flávia Azevedo Carvalho – Membro Suplente
FEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues – Membro Suplente
DEA-FEA/UNICAMP

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de frutooligossacarídeos (FOS) a partir de micro-organismos osmofílicos em um processo de biotransformação utilizando células íntegras microbianas. As linhagens de *Bacillus sp.* e *Aureobasidium pullulans*, previamente isoladas de favo-de-mel e identificadas, foram primeiramente avaliadas quanto aos principais parâmetros de produção utilizando a metodologia de Superfície de Resposta, precisamente pelo Placket-Burman, nos quais foram analisados 12 parâmetros para cada um dos micro-organismos, dentre eles, a concentração da sacarose, inóculo, extrato de levedura, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, pH, temperatura e agitação. O *Bacillus sp.* apresentou 5 fatores significativos, sendo o pH, temperatura e agitação com efeitos negativos e o extrato de levedura e sulfato de amônia com efeitos positivos. Já o *Aureobasidium pullulans* apresentou efeito positivo apenas para sacarose e sulfato de magnésio. O trabalho teve continuidade apenas com a linhagem *Aureobasidium pullulans* utilizando planejamentos experimentais sequenciais, a fim de se obter a faixa ótima de produção de FOS totais para esse processo. Foi realizado um estudo para avaliar o efeito do melaço de usina-de-açúcar como meio para o crescimento e cultivo do inóculo microbiano para o processo, demonstrando que a suplementação com nutrientes tornou-se desnecessária, e o meio para síntese de FOS foi definido em apenas sacarose sem suplementação de nutrientes, com o inóculo na forma de suspensão celular cultivado previamente em melaço. A produção neste momento atingiu valores de 287,6 e 251,5 g/L de FOS totais e rendimentos de 72% e 63% em 24 e 48 horas de incubação respectivamente, com uma produtividade de 10,3 g/L.h às 24 horas. Em seguida foi realizado o planejamento fatorial

fracionado para 4 variáveis definidas em tempo de cultivo e concentração do melão, na etapa do cultivo do inóculo, e as concentração de sacarose e de inóculo para a síntese de FOS. Os valores de produção atingidos pelo planejamento fatorial foram de 333 g/L e 354 g/L de FOS totais e rendimentos de 60,5% e 64% em 24 e 48 horas respectivamente, e produtividade de 13,8 g/L.h às 24 horas de incubação. Nas continuidades experimentais, fixou-se a concentração do melão em 10% de açúcares redutores totais. A otimização pela metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional, possibilitou definir 4 modelos significativos ao processo, atingindo faixas ótimas de produção para cada FOS formado (GF₂, GF₃ e GF₄) e revelou a condição ótima para o processo em 600 a 650 g/L de sacarose e 20 a 23% de inóculo, resultando em uma produção de 351 e 374 g/L de FOS e rendimentos de 53,5% e 57% em 24 e 48 horas respectivamente, nas condições validadas, atingindo uma produtividade de 14,7 g/L.h às 24 horas de incubação. O xarope de cana-de-açúcar foi utilizado como substrato alternativo em substituição à sacarose pura para a produção de FOS, atingindo rendimento de 54%, entretanto a concentração de FOS totais produzidos foi de 110 g/L. A maioria dos experimentos revelou que o micro-organismo osmofílico, *Aureobasidium pullulans*, manteve-se viável e em crescimento durante o período de incubação, em meios com até 600 g/L de sacarose, de acordo com os valores de biomassa e atividade enzimática avaliados durante os cultivos. O processo então, foi avaliado em biorreator de bancada, inicialmente em batelada, e após as 48 horas em sistema contínuo com taxa de diluição de 0,04.h⁻¹ por mais 72 horas. A produção média de FOS totais foi de 228 g/L de FOS totais com uma produtividade média foi de 9 g/L.h.

ABSTRACT

The objective of the present work was evaluate the biotechnological production of FOS by osmophilics microorganisms in a biotransforamtion process using free whole cells. Firstly the effects of production parameters using *Bacillus sp.* and *Auerobasidium sp.* strains. was employed by the Response Surface Methodology (RSM) exactly by Plackett-Burman Design with 12 variables: concentration of sucrose, inoculum, yeast extract, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, pH, temperature and agitation. The *Bacillus sp.* showed 5 significant parameters, as pH, temperature and agitation with negative effect and yeast extract and ammonium sulfate with positive effect. The *Aureobasidium pullulans* presents positive effect only for sucrose and magnesium sulfate concentration, which suggested the inoculum culture was caring nutrients from sugar cane molasses, that was the base of the inoculum cultivation for *Aureobasidium pullulans*. The work has continued only with *Aureobasidium sp.* applying sequential planning experiments to optimize the process. The experiment for evaluate the molasses effect as inoculum cultivation medium on process showed that nutrients supplementation, used in the PB design, wasn't necessary, consequently, the FOS synthesis medium was defined as sucrose, without nutrients supplements and the inoculum as cellular suspension previously cultivated in molasses medium. Total FOS data, at this point, reached 287.6 and 251.5 g/L with 72% and 63% of yield data at 24 and 48 hours respectively, with 12 g/L.h of productivity at 24 hours. Subsequently, the factorial planning was realized with 4 parameters as cultivation time and molasses concentration, in the inoculum cultivation step, and sucrose and inoculum concentration for the FOS synthesis. Almost all these factors showed positive effect, exception of inoculum cultivation time. The total FOS data, at this point, was 333

and 354 g/L with 60.5% and 64% of yield data at 24 and 48 hours respectively, with 13.8 g/L.h of productivity at 24 hours. Regarding these data, the molasses concentration was fixed at 10% of total reduce sugars, remaining only sucrose and inoculum concentration as variables to continue the planning. The two factors optimization was proceed by Central Composite Rotational Design (CCRD) that allowed defined 4 significant process model, aimed optimum production scales for each one FOS (GF₂, GF₃ and GF₄) that reveals the optimum process condition at 600 to 650 g/L of sucrose and 20 to 23% of inoculum, resulting in 351 and 374 g/L of total FOS data and 53.5% e 57% of yield data at 24 and 48 hours respectively, with 14.7 g/L.h of productivity at 24 hours. Sugar cane syrup was evaluated as alternative substrate to pure sucrose for FOS production. The yield data reached was 54%, however the total FOS concentration was 110 g/L due to the small initial sucrose concentration on syrup that was 203 g/L. All the experiments showed significant microorganism growth and increase enzyme activity during the process. For this reason, the process was conducted in a 7L bioreactor, using initially batch system and after 48 hours the system was changed to continuous process with 0.04. h⁻¹ for more 72 hours, with 120 total hours process. Data values showed the 9 g/L.h of productivity and 228 g/L of total FOS concentration.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
Geral.....	7
Específicos.....	7
CAPÍTULO 1	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
MICRO-ORGANISMOS OSMOFÍLICOS: POTENCIAL APLICAÇÃO E NOVAS PERSPECTIVAS PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS.....	11
RESUMO	11
1. Biotecnologia: Breve introdução.....	12
2. Biotecnologia na indústria de alimentos	13
3. Bioconversão de carboidratos	14
4. Prebióticos	15
5. Frutooligosacarídeos (FOS).....	15
6. Processos de obtenção de FOS.....	22
7. Micro-organismos de interesses biotecnológicos	26
8. Micro-organismos osmofílicos.....	27
9. Biotransformação da sacarose e síntese de produtos	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2	43
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA E CURTA A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE PELA LINHAGEM DE BACILLUS SP..	45
RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo.....	47
2.2. Plakett-Burman.....	48
2.3. Análise dos FOS produzidos.....	49
2.4 Análise dos resultados.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
3.1. Análise dos FOS produzidos	51
3.2. Plakett-Burman.....	54
4. CONCLUSÕES	59

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 3	63
PARAMETERS EVALUATION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY SUCROSE BIOTRANSFORMTION USING AN OSMOPHILIC <i>AUREOBASIDIUM PULLULAN</i> STRAIN	65
RESUMO	65
ABSTRACT	67
1. INTRODUCTION.....	68
2. MATERIALS & METHODS	69
3. RESULTS & DISCUSSION.....	70
4. CONCLUSION.....	76
REFERENCES	76
CAPÍTULO 4	79
ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MELAÇO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE EM FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i>	79
RESUMO	79
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo	81
2.2. Biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos (FOS)	82
2.3. Análises dos carboidratos	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
CAPÍTULO 5	91
OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE POR <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> PELA TÉCNICA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	93
RESUMO	93
1. INTRODUÇÃO	93
2. MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo	96
2.2. Estratégia sequencial de planejamentos experimentais para biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos.....	97
2.3. Análise dos frutooligossacarídeos produzidos	99
2.4. Avaliação da concentração celular e crescimento do micro-organismo	100
2.5. Avaliação da atividade enzimática durante o processo.....	100
2.6. Análise estatística.....	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	101
3.1 Planejamento fatorial fracionado.....	102
3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	109

4. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO 6	129
PRODUÇÃO CONTÍNUA DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM MEIO DE SACAROSE E ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE XAROPE DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO.....	131
RESUMO	131
1. INTRODUÇÃO	131
2. MATERIAL E MÉTODOS	133
2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo	133
2.2. Biotransformação da sacarose utilizando xarope como substrato	134
2.3. Biotransformação da sacarose em reator de bancada	134
2.4. Análise dos frutooligossacarídeos produzidos	135
2.5. Avaliação da concentração celular e crescimento do micro-organismo	136
2.6. Avaliação da atividade enzimática durante o processo.....	136
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	137
3.1. Síntese de FOS a partir de xarope de cana-de-açúcar.....	137
3.2. Síntese de FOS em biorreator de bancada	139
4. CONCLUSÕES	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CONCLUSÕES GERAIS	147

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Anna e Newton, a quem devo a minha vida e o tudo o que sou.

Especialmente à minha mãe, a quem eu amo muito. Agradeço pelo amor incondicional, pelo total apoio em todos os momentos de dificuldades e alegrias e por ser sempre ser minha melhor amiga. Declaro aqui minha total admiração e amor.

À minha filha querida e muito amada, Ana Julia, a qual dedico todo o meu trabalho e amor, simplesmente por ser tudo pra mim.

Ao meu esposo querido Celso, eterno companheiro, presente de Deus, a quem eu amo muito.

Ao meu irmão querido Renato e ao meu pai “de coração”, Cláudio, que são essenciais na minha vida. A pequena Isabelinha e a Dri, que tornaram nossas vidas mais felizes.

Aos meus familiares queridos, vó Euvira, Maria Rita, Celso, Juliano, Vivi, Mona, Nelson e Mellzinha e ao amigos queridos, que tornam minha jornada mais fácil, divertida e feliz.

“Visto que nossa vida começa e termina com a necessidade de afeto e cuidado, não seria sensato praticarmos a compaixão e o amor ao próximo enquanto podemos?” (autor desconhecido).

“Se a luta está difícil, não desista! Deus só dá grandes lutas para grandes guerreiros. Quanto maior a luta, maior será sua vitória” (autor desconhecido).

Agradecimentos

Agradeço inteiramente a Deus e Nossa senhora, por me iluminar, proteger, amparar, acalmar, durante todo o período do andamento deste trabalho e por toda a minha vida.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), à UNICAMP por possibilitarem a realização de mais este trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado concedida e à CAPES pela bolsa auxílio à realização de um estágio no exterior.

À professora Gláucia pela orientação e confiança durante a execução desse trabalho.

Ao professor Basso, pela co-orientação e colaboração há muitos anos à mim concedidos.

À professora Maria Isabel Rodrigues pela orientação durante os planejamentos de experimentos, pela qual sou imensamente grata e admiradora, tanto pelo seu trabalho profissional quanto social, no qual proporciona esperança a muitas crianças carentes.

Aos membros da banca examinadora, pelas assíduas correções e contribuições.

Às amigas Verônicas, Jane, Beth Fai, Ana Flávia e Ana Simiqueli, as quais foram determinantes para a execução desta tese e declaro meu carinho muito especial.

Às amigas e amigos do bioaromas Maysa, Renata, Gustavo e aos amigos da bioquímica da ESALQ, Cometa, Elisinha, Renata que tornam o ambiente de trabalho um clima maravilhoso. Muito obrigada pela amizade e apoio. Agradeço também a todos os colegas do laboratório de Bioaromas, Cristino, Lu Malta, Molina, Murilo, Ana Paula, Ana Stela, Daninha, Adriane, Cristiano, Michele e aos amigos e colegas da Bioquímica da ESALQ, Stefania, Camila, Elisangela, Natália, Thalita, pelo convívio, ajuda e apoio essenciais.

A todos os funcionários da FEA, em especial, Nadir, Angélica e Dora, por me ajudarem por todo esse tempo e ao Marquinhos, Marcão e Cosme por facilitarem os trâmites burocráticos para a defesa desta tese.

À Rose, a qual me ajudou imensamente, para que eu pudesse ter tranquilidade para trabalhar em Campinas, durante todos esses anos.

INTRODUÇÃO

A correlação entre alimentos e saúde é inequívoca e atualmente os alimentos funcionais constituem prioridade de pesquisa em todo o mundo.

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de nutrir, promovem a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, destacando-se os oligossacarídeos com efeito prebiótico (LAPARRA & SANZ, 2010).

Os frutooligossacarídeos (FOS) pertencem ao grupo dos prebióticos que são ingredientes não digeríveis, porém fermentáveis pelas bactérias benéficas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, presentes na microbiota intestinal, sendo considerados ingredientes funcionais por promoverem uma série de benefícios à saúde a partir deste mecanismo (MUSSATO & MANCILHA, 2007; KAPLAN & HUTKINS, 2000).

A fermentação desses carboidratos pelas bactérias apresenta como subprodutos ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato, os quais contribuem para baixar o pH do cólon e conseqüentemente, suprimem o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, o acetato é metabolizado em áreas sistêmicas como o músculo, o propionato é utilizado para gerar ATP e o butirato é utilizado pelas células do cólon como fonte de energia e possui propriedades anti-tumorgênicas (RAJENDRAN & KUMAR, 2010; BRUZZESE et. al., 2006).

Estima-se, ainda, que os FOS aumentam a resistência contra infecções, auxiliam na absorção de minerais como o cálcio e o magnésio, aumentam a síntese de vitaminas do complexo B, diminuem o colesterol sérico e a incidência de câncer (DELGADO, TAMASHIRO & PASTORE, 2010; ROBERFROID, 2000).

Os FOS são, portanto, açúcares não convencionais e têm recebido especial atenção por serem altamente hidrossolúveis e apresentarem 40% da doçura equivalente à da sacarose, podendo ser utilizados como adoçantes, com a vantagem de terem baixo aporte calórico e não serem cariogênicos (BOEHM & MORO, 2008).

Do ponto de vista estrutural, os FOS são oligômeros de frutose unidos a moléculas de sacarose sendo os mais conhecidos: 1-kestose, nistose e frutofuranosil - nistose, com uma, duas e três moléculas de frutose, unidas por ligações do tipo β -2-1, respectivamente, sendo considerados FOS cadeias com até 9 moléculas de frutose (HERNALSTEENS & MAUGERI, 2010).

Estes estão presentes em muitos vegetais, os quais chicória, beterraba, alho, cebola, aspargo, yacon, tomate, banana, cevada e centeio são as fontes mais significativas de FOS e inulina. Todavia, a inulina possui a mesma estrutura dos FOS, porém constituída de maior tamanho, as quais são classificadas como polissacarídeos da classe das frutanas (NAIR, KHARB & THOMPSON, 2010; SANGUEETA, RAMESH & PRAPULLA, 2005; HAULY & MOSCATTO, 2002).

Atualmente os FOS são classificados de acordo com o tamanho de sua cadeia molecular, sendo considerados de cadeia curta aqueles com até quatro moléculas de frutose e os demais de cadeia longa. É interessante destacar que muitos estudos sugerem diferenças na metabolização destes oligossacarídeos, de acordo o grau de polimerização dos mesmos (STEWART, TIMM & SLAVIN, 2008). Van der Meulen *et al.* (2006) relataram que a bactéria *Bifidobacterium longum* fermenta preferencialmente os FOS de cadeia curta e depois os de cadeia longa.

Estes oligossacarídeos podem ser obtidos pela extração de vegetais ou pela hidrólise da inulina e, ainda, serem produzidos via biotecnológica a partir da sacarose utilizando-se a enzima frutossiltransferase, de fontes vegetais ou microbianas (NING *et al.*, 2010).

Uma alternativa que vem se destacando nos últimos anos por sua rentabilidade, é a síntese destes compostos pela biotransformação da sacarose, contida em substratos com altas concentrações, através de células microbianas íntegras, o que permite a síntese em uma única etapa, eliminando a etapa de produção da enzima (NING *et al.*, 2010, SILVA, 2008).

Contudo, o rendimento e as características dos FOS, produzidos desta maneira, dependem de diversos fatores, como o micro-organismo utilizado, natureza e concentração do substrato, processo de obtenção, composição do meio, entre outros fatores (KURAKAKE *et al.*, 2010; PRATA *et al.*, 2010; NEMUKULA *et al.*, 2009).

Assim, tendo em vista as propriedades desses carboidratos não convencionais e a relevância deste segmento no panorama atual, a presente tese tem como objetivo otimizar a síntese de FOS através da biotransformação da sacarose a partir de leveduras e bactérias previamente selecionadas. Pretende-se ainda, avaliar fontes alternativas de substratos com altos teores de sacarose para a produção destes oligossacarídeos, e para crescimento do micro-organismo e obtenção do inóculo.

REFERÊNCIAS

BOEHM, G.; MORO, G. Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. **Journal of Nutrition**, v.138, p. 1818-1828, 2008.

BRUZZESE, E.; VOLPICELLI, M.; SQUAGLIA, M.; TARTAGLIONE, A.; GUARINO, A. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, S.2, n. 38, p.S283-S287, 2006.

DELGADO, G.T.C.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; PASTORE, G.M. Immunomodulatory effects of fructans. **Food Research International**, v.43, p. 1231-1236, 2010.

HAULY, M.C.O.; MOSCATTO, J.A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p.105-118, 2002.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylating activity from *Candida* sp. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p.568-576, 2010.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52,n.5, p. 1181-1187, 1988.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobactérias. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p. 2682-2684, 2000.

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

KURAKAKE, M.; MASUMOTO, R.; MAGUMA, K.; KAMATA, A.; SAITO, E.; UKITA, N.; KOMAKI, T. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 488-492, 2010.

LAPARRA, J.M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, p. 219–225, 2010.

MUSSATO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p.587-597, 2007.

NAIR, K.K.; KHARB, S.; THOMPSON, D.K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes: a review. **Food Reviews International**, v.26, p. 189-203, 2010.

NEMUKULA, A.; MUTANDA, T.; WILHELM, B.S.; WHITELEY, C.G. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2040–2045, 2009.

NING, Y.; WANG, J.; CHEN, J.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X. Production of neo fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7472-7478, 2010.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; GARCIA, C.E.; Curso de Treinamento em Microbiologia, Piracicaba, FERMENTEC, ESALQ/USP, 36 p., 1996.

PRATA, M.B.; MUSSATO, S.I.; RODRIGUES, R.L.; TEIXEIRA, J.A. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. **Biotechnology Letters**, DOI 10.1007/s10529-010-0231-y, 2010.

PROSKY, L.; HOEBREGS, H. Methods to determine food inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1418S-1423S, 1999.

RAJENDRAN N.; KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n.12, p.1442-1448, 2010. ROBERFROID, M. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.1682-1687, 2000.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos – uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Editora Casa do Pão, Campinas, SP, Brasil, 2005. 326 p.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends In Food & Technology**, v. 16, p.442-457, 2005.

SILVA, J.B. **Seleção de micro-organismos osmofílicos isolados de favo-de-mel para produção de frutooligosacarídeos por fermentação**. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

STEWART, M.L.; TIMM, D.A.; SLAVIN, J.L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. **Nutrition Research**, v.28, p. 329-334, 2008.

SZMRECSÁNYI, T. (1979). **O Planejamento da Agroindústria Canavieira do Brasil (1936-1975)**, São Paulo, Editora Hucitec, 1979.

VAN DER MEULEN, R.; MAKRAS, L.; VERBRUGGHE, K.; ADRIANY, T.; DE VUYST, L. In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.2, p. 1006-1012, 2006.

OBJETIVOS

GERAL

Estudo da biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos (FOS) por micro-organismos osmofílicos

ESPECÍFICOS

- Avaliação dos parâmetros significativos para produção de FOS pela biotransformação da sacarose por *Bacillus sp.* isolado de favo de mel.
- Avaliação dos parâmetros significativos para produção de FOS pela biotransformação da sacarose por *Aureobasidium pullulans* isolado de favo de mel.
- Estudo da influência do melaço do processo de biotransformação de sacarose em FOS por *Aureobasidium pullulans*.
- Estratégias de otimização de processo para produção de FOS por *Aureobasidium pullulans*.
- Produção contínua de frutooligossacarídeos em meio de sacarose e estudo da utilização de caldo de cana-de-açúcar concentrado como substrato alternativo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MICRO-ORGANISMOS OSMOFÍLICOS: POTENCIAL APLICAÇÃO E NOVAS PERSPECTIVAS PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Artigo a ser submetido ao periódico Química Nova

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

MICRO-ORGANISMOS OSMOFÍLICOS: POTENCIAL APLICAÇÃO E NOVAS PERSPECTIVAS PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são ingredientes de grande importância na indústria de alimentos e têm despertado muita atenção nos últimos anos por possuírem aplicações variadas e serem considerados alimentos com propriedades funcionais. Sua produção biotecnológica se destaca por apresentar alta rentabilidade e ser passível de otimização mediante o controle e aperfeiçoamento das condições reacionais. A biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos utilizando células íntegras ainda é pouco explorada, uma vez que a maioria dos processos utilizam enzimas como biocatalisadores em meios contendo altas concentrações de sacarose. Entretanto, existe a possibilidade de se utilizar micro-organismos osmofílicos para esta finalidade, os quais se desenvolvem em altas concentrações de açúcar, além de possuírem características altamente desejadas para bioprocessos. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo

contextuar o papel dos carboidratos e da utilização de micro-organismos osmofílicos na indústria e seu potencial para a utilização para obtenção de frutooligosacarídeos.

1. Biotecnologia: Breve introdução

A utilização de micro-organismos com propósitos de se obter produtos de interesses é empregada desde as primeiras civilizações conhecidas, sem mesmo que o homem entendesse a biologia desse processo (BORÉM, 2005). Há seis mil anos antes de Cristo, processos fermentativos eram utilizados para produção de bebidas fermentadas e dois mil anos depois o homem já dominava a aplicação de fermento para a produção de pão. Ao longo dos séculos, os empregos das técnicas fermentativas propiciaram o desenvolvimento de produtos como os queijos, iogurtes, vinagres, pickles, vinhos e cervejas (JOGLEKAR *et al*,1983). Sendo assim, pode-se dizer que a biotecnologia, caracterizada inicialmente como o emprego de micro-organismos em processamentos para obtenção de produtos de interesse, tem como marco inicial a produção de alimentos.

Apenas a algumas centenas de anos, a partir do século XVIII, os micro-organismos foram descobertos e reconhecidos, e a bioquímicas e os processos biotecnológicos ganharam forças nas ciências biológicas. Desde a segunda guerra mundial (1939-1945), os processos biotecnológicos são largamente utilizados e esforços foram concentrados para ampliar a escala industrial para obtenção de produtos como a penicilina (BORZANI *et al.*, 2001).

A Convenção de Diversidade Biológica (CBD), criada em 1992, é um tratado da Organização das Nações Unidas (ONU), sendo hoje o principal fórum mundial para questões relacionadas ao meio ambiente, define o termo biotecnologia como “qualquer aplicação

tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou derivados, a fim de modificar produtos ou processos para uso específico” (CBD, 2000).

Os principais produtos da biotecnologia estão presentes na indústria farmacêutica como a produção de hormônios, antibióticos, vacinas, na indústria química como o etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido láctico, ácido cítrico, hidrogênio, metano, poliésteres, polímeros, surfactantes entre outras variedades, e na indústria de alimentos como a produção de aminoácidos, aromas, flavorizantes, polímeros, açúcares não convencionais como polissacarídeos e oligossacarídeos entre outros, além do uso de micro-organismos para a produção de incontáveis enzimas de interesse industrial (BORZANI *et al.*, 2001; PEREIRA JUNIOR; BON; FERRARA, 2008, BICAS *et al.*, 2010)

As vantagens dos processos que utilizam micro-organismos e células para obter novos produtos estão na não escassez da sua fonte, pois os cultivos microbianos não estão sujeitos às variações climáticas e à quantia presente no ambiente, bem como por apresentarem rendimentos relativamente altos, devido à alta capacidade de transferência de massa das células (JOGLEKAR *et al.*, 1983). Outra vantagem desses processos está na utilização da biomassa ou resíduos da agroindústria como substratos para serem convertidos em materiais de maior valor agregado (BUCHHOLZ & SEIBEL, 2008). Portanto, o principal objetivo dos bioprocessos é estabelecer procedimentos não dispendiosos e que apresentem altos rendimentos de produção (FURUZAWA *et al.*, 2012).

2. Biotecnologia na indústria de alimentos

Para a indústria de alimentos, a biotecnologia atualmente oferece uma maneira alternativa de produzir alimentos considerados naturais, que oferecem benefícios à saúde e previnem

doenças. Alimentos desta natureza são uma atual exigência do crescente mercado consumidor que busca alimentos que não são apenas nutritivos, mas além disso, possuam propriedades funcionais e sejam produzidos a partir de fontes e processos naturais (HSIEH & OFORI, 2011). Sendo assim, a biotecnologia aplicada à área de alimentos, vem a atender a necessidade de se obter alimentos e ingredientes com apelos naturais e funcionais de uma maneira eficaz e proporcionar menor impacto ao meio ambiente. Exemplos são a obtenção de oligossacarídeos prebióticos (SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE, 2009; SILVA *et al.*, 2011; FAI *et al.*, 2011;), corantes, aromas (BICAS *et al.* 2010; DIONÍSIO *et al.*, 2007), antioxidantes, biosurfactantes (BARROS *et al.*, 2007) entre outros.

3. Bioconversão de carboidratos

Os carboidratos são as principais fontes de carbono utilizadas como substrato nos meios de cultivo para os micro-organismos, fornecendo energia e servindo como base para a formação de muitos outros produtos. Segundo Buchholz & Seibel (2008), “a maioria dos processos que envolvem carboidratos na indústria incluem a transformação biotecnológica”.

Uma visão global de alguns dos atuais processos que se destacam perante a produtividade, nos permite confirmar a vasta utilização dos carboidratos em processos biotecnológicos, como processos de obtenção de cervejas e vinhos, que movimentam uma produção em torno de 170.10^3 ton/ano, os oligossacarídeos que representam valores de 6.10^3 ton/ano, obtenção de isomaltulose, açúcar invertido entre outros produtos da indústria de alimentos. A fabricação de vitamina C, ácido cítrico e de ácido glucônico, por exemplo, geram uma produção maior que 100.10^3 ton/ano na indústria farmacêutica, e, além desses, outros produtos relevantes como o etanol,

polissacarídeos, ciclodextrinas e outros são produzidos em larga escala por diversas indústrias a partir de carboidratos como matérias primicas (BUCHHOLZ & SEIBEL, 2008).

4. Prebióticos

A bioconversão de açúcares em oligossacarídeos prebióticos ocupa um lugar de destaque no mercado de alimentos funcionais. Estima-se que a demanda global por estes alimentos, tem crescido nos últimos 10 anos, cerca de 500 mil toneladas ao ano (WANG *et al.*, 2009; SHAAFSMA, 2008).

Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis seletivamente metabolizados pelas bactérias benéficas do intestino, como os lactobacilos e as bifidobactérias, implicando diretamente na modulação dietética da microbiota intestinal, trazendo benefícios à saúde do hospedeiro (MANNING & GIBSON, 2004).

Há inúmeros oligossacarídeos e polissacarídeos reconhecidos como prebióticos como os frutooligossacarídeos (FOS), a inulina e os inulooligossacarídeos (IOS), galactooligossacarídeos (GOS), xilooligossacarídeos (XOS), maltooligossacarídeos (MOS), isomaltooligossacarídeos (IMO), oligossacarídeos de soja, (SOS), sucralose, lactulose, levanas, entre outros (WANG *et al.*, 2009; AL-SHERAJI *et al.*, 2013) .

5. Frutooligossacarídeos (FOS)

Dentre os oligossacarídeos citados acima, os frutooligossacarídeos (FOS) são os mais largamente produzidos e consumidos, principalmente na Europa e Japão. A média do consumo diário desses compostos está entre 1 a 4 g nos Estados Unidos, 3 a 11 g na Europa, na Holanda de 2 a 12 g/dia per capita e no Japão o consumo está estimado em 13,7 mg.Kg⁻¹ dia⁻¹ (PASSOS &

PARK, 2002; AL-SHERAJI *et al.*, 2013, ROBERFROID, 2002). Sua atratividade também se deve ao fato de sua produção ser relativamente simples e seu sabor doce ser muito similar ao da sacarose (YUN, 1996).

5.1. Efeitos Funcionais

Os frutooligossacarídeos (FOS) são um dos mais populares oligossacarídeos prebióticos estudados e possuem reconhecido efeito bifidogênico (MANNING & GIBSON, 2004; SALAZAR *et al.*, 2009). Após serem fermentados preferencialmente pelas bifidobactérias e lactobacilos, presentes no cólon intestinal, ácidos graxos de cadeia curta são produzidos como o ácido acético, propiônico e butírico e lactato. Estes compostos promovem indiretamente uma modulação na microbiota intestinal, acidificando o meio e favorecendo o crescimento das bactérias bifidogênicas, já mencionadas, em detrimento de bactérias putrefativas como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

Além disso, diminuem o trânsito intestinal, fornecem energia para as células do epitélio colônico, melhoram a absorção de minerais como Ca^{+2} e Mg^{+2} , são efetivos no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, auxiliam na diminuição do colesterol e metabolismo dos lipídeos, e estimulam o sistema imunológico (ROBERFROID, 2000; MANNING & GIBSON, 2004; DELGADO, TAMASHIRO & PASTORE, 2010).

Outra recente descoberta está na produção dos exopolissacarídeos, que são biopolímeros produzidos pelas bifidobactérias e bactérias lácticas, os quais também estão associados à diminuição do colesterol e capacidades imunomodulatórias (SALAZAR *et.al.*, 2009).

5.2. Mecanismo de reação enzimática de formação de FOS em plantas e por micro-organismos

Os oligossacarídeos de frutose, denominados frutooligossacarídeos (FOS) são vastamente encontrados em plantas e produzidos por micro-organismos.

O mecanismo pelo qual estes carboidratos são *formados* é muito estudado (YUN, 1996; MONSAN & PAUL, 1995). Tanto nas plantas como através dos micro-organismos a sua formação se deve às enzimas hidrolíticas, pertencentes à classificação das hidrolases como a frutofuranosidase (EC.3.2.1.26), também conhecida como invertase, e às enzimas de transferência, denominadas transferases, como as frutossiltransferases (EC.2.4.1.9). A grande diferença entre essas enzimas é que as reações de transferência ocorrem apenas na presença de altas concentrações de substrato para as hidrolases, através da reação reversa à hidrólise, e independente deste fator para as transferases. Essas enzimas catalisam reações de transferência do grupamento frutossil da molécula de sacarose, a qual atua como doadora e receptora de frutose (YUN, 1996; MONSAN & PAUL, 1995, ALMÉCIGA-DÍAZ *et al.*, 2011).

Os FOS diferem de acordo com o tamanho da cadeia e a ligação entre as moléculas de frutose, dependendo da sua enzima de formação. De acordo com IUB-IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), oligossacarídeos são definidos como sacarídeos ou carboidratos que contém de 3 a 10 unidades de monossacarídeos em sua cadeia. Sendo assim, os oligômeros de frutose podem conter de 9 a 10 moléculas de frutose em sua composição. Porém muitos autores consideram essa definição como moléculas que contenham até 10 graus de polimerização. Acima desse valor são denominados polissacarídeos frutanos ou “frutanas”,

diferindo entre levanas e inulina, cujas moléculas podem conter até 60 unidades de frutose em sua cadeia (ROBERFROID, 2002; YUN, 1996; SILBIR *et al.*, 2014).

As cadeias de frutose podem conter ligações do tipo 1^F e 6^G e 6^F . O primeiro tipo possuem unidades de frutose unidas por ligações osídicas do tipo β -2,1, sendo os FOS mais conhecidos kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil-nistose (GF_4) e o polissacarídeo inulina (SANGEETHA, RAMESH, & PRAPULLA, 2005; YUN, 1996; SILBIR *et al.*, 2014).

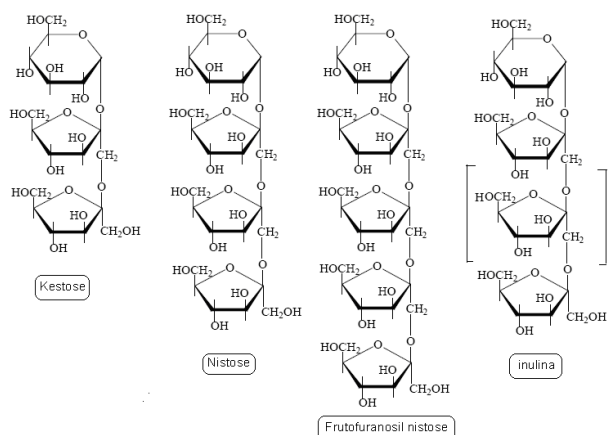


Figura 1: Frutooligossacarídeos do tipo 1^F (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

Os 6^G são denominados neofrutooligossacarídeos (NeoFOS), possuem ligações osídicas do tipo β -2,6, entre unidades de frutose e glicose, denominados neokestose (GF_2), neonistose (GF_3) e neofrutofuranosilnistose (GF_4). Já os do tipo 6^F possuem ligações osídicas do tipo β -2,6 entre unidades de frutose e os mais conhecidos são 6-kestose (GF_2), 6-nistose (GF_3) e 6-frutofuranosilnistose (GF_4). As levanas são polímeros de frutoses unidas por ligações osídicas do tipo β -2,6, como ilustrados na Figura 2 (YUN & SONG, 1999; STRAATHOF *et al.*, 1986). Os GFs de até 4 graus de polimerização são os mais conhecidos, entretanto existem oligos intermediários de 4 a 11 unidades de frutose (PARK, OH & YUN, 2001; MUTANDA, WILHELMIM & WHITELY, 2008).

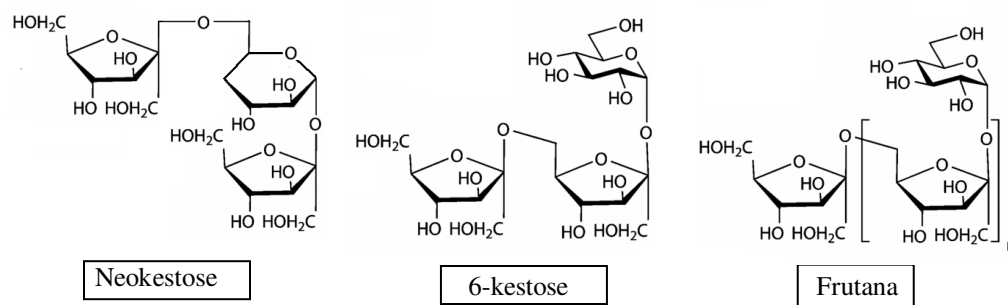


Figura 2: Frutooligossacarídeos do tipo 6^G (Neo FOS) e 6^F (APOLINÁRIO *et al.*, 2014).

Os FOS são considerados oligossacarídeos de alto valor comercial, pelos quais amplos interesses são altamente evidenciados pela indústria de alimentos, por serem ingredientes nutracêuticos, funcionais e de baixo aporte calórico (FIALHO *et al.*, 2013; VIJN & SMEEKENS, 1999).

São açúcares com potencial de adoçar em torno 0,4 a 0,6 vezes em relação ao poder doce da sacarose. São considerados não cariogênicos e podem ser consumidos por diabéticos, por não serem hidrolisados pelas enzimas digestivas e, portanto, não serem metabolizados pelo organismo (ALMÉCIGA-DÍAZ, 2001; SANGUEETHA *et al.*, 2005).

As moléculas de menor tamanho possuem maior poder edulcorante, por outro lado, as de maior tamanho são bons emulsificantes e possuem sabor neutro, sendo muito utilizados como espessantes e substitutos de gordura na indústria de alimentos (BLANCH *et al.*, 2011). Devido às propriedades mencionadas, os FOS e as frutanas são largamente utilizados como ingredientes farmacêuticos, para produção de polímeros solúveis em água, como componentes nutricionais de alimentos e bebidas, como espessantes em produtos lácteos, cosméticos, entre outras aplicações de alimentos (GUIO *et al.*, 2009)

5.3. Ocorrência de frutooligossacarídeos e frutanas em plantas

São encontrados naturalmente em muitas plantas e alimentos como chicória (*Chichorium intybus*), alcachofra, alcachofra de Jerusalém, yacon, cebola, banana, tomate, alho, aspargo, agave americana, mel e cana-de-açúcar (ROBERFROID, 2002, BLANCH *et al.*, 2011).

A sua formação nas plantas é fortemente influenciada pelas condições ambientais e estágio de desenvolvimento, como por exemplo, baixas temperaturas induzem o acúmulo de frutanas nas folhas e raízes de espécies *Agropyron* (CHATTERTON *et al.* 1988). Estes carboidratos proporcionam às plantas, a capacidade de tolerar temperaturas baixas e de congelamento (EAGLES *et al.*, 1967, BLANCH *et al.*, 2011). São carboidratos de reservas complementares às reservas de amido e possuem funções osmorregulatórias, devido à capacidade de serem convertidos do estado de polímeros e oligômeros inertes a monossacarídeos ativos osmoticamente (ALMÉCIGA-DÍAZ *et al.*, 2011). As reservas de frutanas são disponibilizadas como fontes de substratos para crescimento das plantas em baixas temperaturas (LAERE & ENDE, 2002).

Em algumas plantas e micro-organismos, a síntese de FOS pode envolver uma ou mais enzimas, como na alcachofra de Jerusalém, em que envolve duas enzimas, a sacarose: sacarose 1F frutossil-transferase (SST) e a frutana : frutana 1F frutossil-transferase (FFT) (YUN, 1996; APOLINÁRIO *et al.*, 2014).

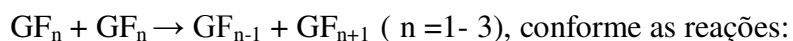
5.4. Ocorrência em micro-organismos

São produzidos por uma vasta variedades de micro-organismos incluindo fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (YUN, 1996, SANGUEETA *et al.*, 2005), *Gliocladium virens* (FIALHO *et al.*, 2013), *Sporutrichum thermophile* (KATAPODIS

et al., 2004), *Scopulariopsis brevicaulis* (TAKEDA *et al.*, 1994), leveduras em fase transitória com fungos, como o *Aureobasidium sp.* (YUN, 1996, Silva *et al.*, 2011, DOMINGUES *et al.*, 2012), e outras leveduras como *Rhodotorula sp.*(MAUGERI & HERNALSTEENS, 2007; AGUIAR-OLIVEIRA, 2012), *Klyveromyces marxianus* (SANTOS *et al.*, 2007), *Xanthophylomyces dendrohous* (LINDE *et al.*, 2012 & KRITZINGER *et al.*, 2003), *Schwanniomyces occidentalis* (ALVARO-BENITO *et al.*, 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (STRAATHOF *et al.*, 1986) e bactérias, como *Bacillus e Zymomonas mobilis* (BYUN *et al.*, 2007; BEKERS *et al.*, 2002).

Segundo Yun (1996), a síntese de FOS é observada durante o cultivo de fungos em meio de sacarose, e estes podem ser consumidos como fonte de energia quando o teor de sacarose no meio se torna inadequado. Os oligossacarídeos possuem duas funções durante o processo, a primeira é eliminar a frutose livre no meio, que em grandes concentrações, pode implicar num retardo do crescimento microbiano, e a segunda seria uma forma de estocar carboidrato e diminuir a pressão osmótica do meio.

O modelo matemático de formação dos FOS pela ação da frutossiltransferase de microorganismos como *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus niger*, foi proposto por muitos pesquisadores, em que a reação se inicia através de duas moléculas de sacarose (GF), sendo que uma das moléculas possui a função de doação de um grupamento frutossil e a outra molécula possui a função de aceptora formando a kestose (GF₂) (YUN, 1996; JUNG *et al.*, 1989; DUAN *et.al*; 1994).



- (1) $2 \text{ GF} \rightarrow \text{GF}_2 + \text{G}$;
- (2) $2 \text{ GF}_2 \rightarrow \text{GF}_3 + \text{GF}$;
- (3) $(3) 2 \text{ GF}_3 \rightarrow \text{GF}_4 + \text{GF}_3$

Yun *et al.* (1996) sugeriram o mesmo modelo sob outro aspecto, ilustrado pela Figura 3, na qual se pode observar claramente a formação dos FOS ocorrendo em cadeia e a síntese de GFs de maior grau de polimerização depende da hidrólise dos menores. Além disso, é possível observar o retorno de moléculas de glicose (G), sacarose (GF) e kestose (GF₂) ao meio reacional.

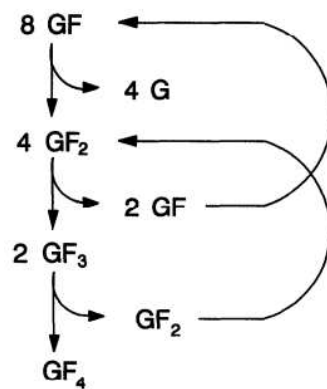


Figura 3: Mecanismo de síntese de frutooligossacarídeos a partir da sacarose (GF) pela enzima frutossiltransferase de *Aureobasidium pullulans* (YUN, 1996).

6. Processos de obtenção de FOS

Industrialmente são produzidos a partir da sacarose por enzimas microbianas com atividade de transfrutossilacção, principalmente por micro-organismos como o *Aspergillus niger* e o *Aureobasidium pullulans* (YUN, 1996; SANGUEETA, RAMESH & PRAPULLA, 2005).

No Japão, a indústria Meiji Seika Ltda, produz FOS utilizando enzimas imobilizadas de *Aspergillus niger*. Este produto é comercializado como “Neosugar”, “Profeed”, “Meiologo”, ou “Nutraflora”. Outro exemplo é a Cheil Foods & Chemicals Co., Coréia, que utiliza enzimas imobilizadas de *Aureobasidium pullulans* (YUN, 1996; PASSOS & PARK, 2003). Também há muitos FOS obtidos pela hidrólise enzimática de inulina, extraída de vegetais, como a Raftilose, produzido pela Orafiti Ltda, da Bélgica, ou “Frutafit”, fabricado pela Imperial-Suikner Unie, holandesa. (PASSOS & PARK, 2003).

Mais recentemente encontramos produtos como o Actlight, fabricados pela “joint venture” Benghin Meiji, japonesa e a Teorous group, francesa, cujo produto é muito comercializado na Europa (BEGHIN-MEIJI, 2013). Atualmente, o mercado chinês está ganhando espaço na comercialização global de FOS a preços mais acessíveis como U\$10,00/kg, além de produzirem e comercializarem também outros prebióticos como os xilooligossacarídeos (XOS).

Apesar de serem produzidos também a partir da extração e hidrólise da inulina de fontes vegetais, a produção via biotecnológica utilizando micro-organismos apresenta inúmeras vantagens referentes aos bioprocessos com relação à produção extrativa. Nos processos que utilizam catálise enzimática para síntese desses compostos, as enzimas derivadas de micro-organismos também apresentam vantagens em relação às enzimas vegetais, por possuírem maior tamanho e apresentarem maior termoestabilidade (ALMÉCIGA-DIAZ *et al.*, 2011).

O rendimento teórico máximo para a síntese de FOS a partir da sacarose considerando apenas a formação de 1-kestose é de 75% (YOSHIKAWA *et al.*, 2008; SANCHEZ *et al.*, 2008). Esse valor ainda não foi obtido nos processos atuais, por isso, ainda há muitas pesquisas sendo realizadas com o intuito de aperfeiçoar a produção e diminuir custos de processo utilizando metodologias alternativas às atualmente utilizadas.

Entre estas estratégias, cita-se a busca por micro-organismos mais robustos e de fácil manipulação, a utilização de diferentes maneiras para imobilizar a enzima para promover um maior tempo de utilização da enzima no processo (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 2013), metodologias alternativas para produção da enzima, como a produção em meios semi-sólidos compostos de resíduos lignocelulósicos agroindustriais (TRIVEDI, DIVESHA & SHAH, 2012), processos contínuos e processos fermentativos ou biotransformação, cuja síntese desses açúcares envolve apenas uma etapa, na qual a enzima e o produto são obtidos no mesmo estágio de processamento (DOMINGUES *et al.*, 2012; NING *et al.*, 2012; SILVA *et al.* 2011; MADLOVÁ, *et al.*, 2000).

Muitos pesquisadores, ainda, têm se esforçado para melhorar a produção de FOS, focando em selecionar e melhorar geneticamente linhagens e utilizar estratégias de otimização de processos para obter maiores produtividades e rendimento (SANGEETHA, RAMESH & PRAPULLA, 2005). Alguns desses estudos estão apresentados resumidamente na tabela 1.

Tabela 1: Produção de FOS a partir de micro-organismos em diferentes processos.

Micro-organismo	Processo	Rend./Prod.	Referência
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Células íntegras	238 g/L	Ning <i>et al.</i> , 2012
<i>Gliocladium virens</i>	Fermentação submersa	3 g/L	Fialho <i>et al.</i> , 2013
Frutossiltransferases <i>industriais</i> fúngicas	Enzimas	58%-62%	Vega-Paulino & Zúniga-Hansen, 2012
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Enzima intracel.	73,9 g/L neoFOS	Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus japonicus</i>	Enzima produzida em meio sólido	128,3 g/L	Mussato & Teixeira, 2010
<i>Aspergillus sp</i> N74	Cél. (fonte intracelular de enzima)	70%	Sanchez <i>et al.</i> , 2008
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Enzima bruta	69%	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2008

<i>Pseudomonas aurantiaca</i> + <i>Zymomonas mobilis</i>	Enzima	24-26%	Byun <i>et al.</i> , 2007
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Enzima extracelular.		Álvaro-Benito <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i> St-0018 e <i>Aspergillus foetidus</i> St-00194	Enzima intracelular. Síntese de FOS trealose e palatinose.		Markosyan, <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Enzima comercial do fungo purificada.	60%	Ghazi <i>et al.</i> , 2007
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var <i>bulgaricus</i>	Biorreator com enzima extracelular livre e imobilizada.	50 g/L	Maugeri e Santos, 2007
<i>A.japonicus</i> e <i>A.niger</i>	Enzima intracelular bruta	60%	Dorta <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhodotorula sp</i>	Enzima extracelular	52- 63%	Maugeri e Hernalsteens, 2007
<i>Penicillium citrinum</i>	Cel. imobilizadas (enzima intracelular); Síntese de neoFos.	49 g/L;55%	Park <i>et al.</i> , 2005; Hayashi <i>et al.</i> , 2000.
<i>Streptococcus mutans</i>	Enzima imobilizada		Rozen, Steinberg, Bachrach, 2004;
<i>Penicillium rugulosum</i>	Enzima bruta	80%	Barthomeuf e Pourrat, 2004
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Fermentação submersa	12,5 g/L	Katapodis <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202 e <i>Aureobasidium pullulans</i> CFR 77	Enzima extracelular de <i>A. oryzae</i> e 57% pela enzima extracelular de <i>A.pullulans</i> .	50-54%	Sangeeta, Ramesh e Prapulla, 2004.
<i>Aspergillus japonicus</i> CCRC 93007 ou <i>Aureobasidium pullulans</i> ATCC 9348 com <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23771	Processo fermentativo contínuo com células mistas das culturas (fontes de FTase e glicose desidrogenase) e um sistema de filtração por membrana para separação dos FOS.	80 %	Sheu <i>et al.</i> , 2002
<i>Zymomonas mobilis</i>	Enzima extracelular. Síntese de levana e FOS	30%	Bekers <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus japonicus</i>	Células imobilizadas (enzima intracelular) processo contínuo	60% 173g/h.L	Chien, Lee e Lin, 2001
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> SRT4	Enzima extracelular	50%	Trujillo <i>et al.</i> (2001);
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	Enzima extracelular.Produção seletiva de GF4 (42%); produção de GF5 e GF6	32,3%	Park, Oh e Yun, 2001
<i>Bacillus subtilis</i> C4	Produção de FOS e levana a partir da enzima extracelular		Euzenat, Guibert e Combes , 1996

A partir dos estudos apresentados na Tabela 1, é possível perceber que a síntese de FOS é realizada, na maioria dos trabalhos, através de processos que envolvem a catálise enzimática a partir de enzimas microbianas e poucos relatam a utilização de micro-organismos diretamente no processo.

Muitos estudos comprovaram que a produção da enzima frutossiltransferase e a reação de transfrutossilacção para a formação de FOS é influenciada positivamente pela concentração de sacarose, com valores acima de 40%, entre outros fatores (VEJA & ZÚNIGA-HANSEN, 2013; YUN, 1996, SANGUEETA *et al.*, 2005, GHAZI *et al.*, 2006; NEMUKULA *et al.*, 2009).

Tendo em vista que a síntese de FOS é estimulada pela alta concentração de substrato, para utilizar processos com células íntegras e mantê-las ativas e viáveis durante o processamento, torna-se pré-requisito empregar micro-organismos osmofílicos (KATAPOSIS *et al.*, 2004), tolerantes e que se desenvolvem em altas concentrações de açúcares e que apresentem alta taxa de conversão do substrato em produto (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2008; SCHMIDELL, 2001).

7. Micro-organismos de interesses biotecnológicos

O agente biológico ou catalisador de um bioprocessamento deve possuir pré-requisitos essenciais para o bom funcionamento de um processo. Sendo assim, é primordial que o micro-organismo apresente alta eficiência na conversão do substrato em produto de interesse. Consequentemente, apresentar uma alta produtividade e rendimento, ser estável fisiologicamente, apresentar-se robusto em condições como altas temperaturas, elevada pressão osmótica no meio, presença de compostos tóxicos, variação de pH, não exigir meios de cultivos e condições de processos complexas e dispendiosas, serem de fácil manipulação entre outras características (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2008; SCHMIDELL, 2001).

Os métodos utilizados nos bioprocessos influenciam economicamente a viabilidade da produção, sendo que o micro-organismo empregado, o meio de cultivo, o tempo de processamento e os métodos de cultivo são fatores de suma importância a serem considerados na avaliação de custos de um processo. Comparativamente a outros micro-organismos, as leveduras e bactérias apresentam vantagens na maioria dos processos industriais, por crescerem bem em uma variedade de meios, serem tolerantes a uma ampla faixa de variação de pH, se reproduzirem rapidamente apresentando curta fase lag de crescimento, crescerem em uma variedade de temperaturas, poderem ser facilmente separadas do meio de cultivo, além de serem mais fáceis e passíveis de manipulações genéticas. Portanto, em geral, as leveduras e bactérias são mais economicamente eficientes para a utilização em processos industriais (HUANG & TANG, 2007).

8. Micro-organismos osmofílicos

A capacidade de sobreviver em ambientes hostis contendo alta pressão osmótica, alta concentração de sais ou açúcares e baixa atividade de água (KUNCIC *et al.*, 2013; ESAWY *et al.*, 2011; BROWN, 1976), despertam interesses em estudos voltados para a aplicação industrial dos micro-organismos osmofílicos.

Muitos micro-organismos são incapazes de sobreviver em ambientes com baixa atividade de água, outros são apenas tolerantes e, em contrapartida, existem os que são capazes de se desenvolver e prosperar nesses ambientes. Os primeiros são chamados de halotolerantes, já os que se desenvolvem em concentrações de NaCl entre 15-30% são denominados halófilos extremos e os que vivem e se desenvolvem em altas concentrações de açúcares são denominados osmofílicos (MADIGAN, 2011; KUNCIC *et al.*, 2013).

Com exemplos de bactérias halotolerantes cita-se o *Staphylococcus aureus*, encontrado em meios de até 11% de NaCl. Entre as halofílicas extremas destaca-se a *Halobacterium salinarum* que vivem entre 11 até mais de 20% de NaCl (MADIGAN, 2011. p.173; BROWN, 1976) e, como exemplo de osmofílicas estão os *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes*, entre outras espécies (SINACORA *et al.*, 2013; ESAWY *et al.* 2011; SILVA, BASSO & PASTORE, 2011; BROWN, 1976)

Os fungos e as leveduras possuem uma maior capacidade de se desenvolver em meios com menos de 0,85 de atividade de água, representando soluções de 50% de glicose e 17% de NaCl, como os gêneros *Penicillium*, *Wallemia*, *Moniliella*, *Aspergillus*, *Chrysosporum*, *Eurotium*, *Xeromyces*, e leveduras como *Saccharomyces rouxi*, *S. baili*, *Debaryomyces*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Zygosaccharomyces* entre outras (BROWN, 1976; MOON *et al.*, 2010; KUNCIC *et al.*, 2013).

8.1. *Aureobasidium sp.*

É um dos micro-organismos que mais se destacam na capacidade de síntese de FOS, sendo utilizado na produção desse composto industrialmente, como supracitado anteriormente (YUN, 1996; SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, 2005).

É uma levedura em fase transitória com fungo denominado por Lin *et al.* (2001) “yeast-like-fungi”, por apresentar polimorfismo celular, tanto podendo estar presente na *form* unicelular ou pluricelular exibindo hifas, pseudohifas e pseudomicélios. A Figura 4 ilustra as diferentes morfologias adotadas pelo micro-organismo. É muito encontrado em plantas, incluindo madeira (RAY, 2004), vastamente encontrado na filosfera e em ambientes com alta pressão osmótica (ZALAR *et al.*, 2008).

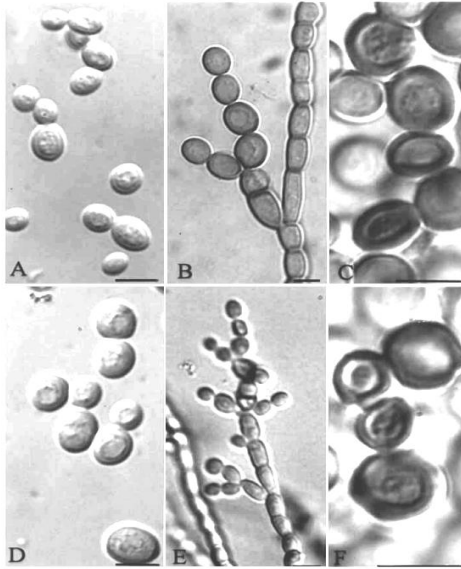


Figura 4: Diferentes morfologias adotadas pelo *Aureobasidium pullulans* em meio MYA apresentando fase leveduriforme com 10 dias de cultivo em A e D; forma de pseudomicélio apresentando blastoconídeos em B e E com 10 dias de cultivo em meio sólido; e esporos com parede celular espessa em culturas de 30 dias (LIN *et.al.*, 2001).

O *Aureobasidium* é considerado uma “levedura osmofílica”, termo dado às leveduras capazes de crescer em ambientes de alta pressão osmótica, tolerantes a altas concentrações de sal ou açúcar, comparativamente a outras espécies de leveduras (ONISH, 1963). Este termo foi primeiramente utilizado em 1966, pelos cientistas Scarr & Rose (1966), que definiram leveduras osmofílicas como “leveduras que se desenvolviam em concentrações acima de 65° Brix em soluções de açúcar”.

Um mecanismo foi proposto para elucidar a capacidade das leveduras como *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aureobasidium* em crescer em meios com baixa atividade de água e altas concentrações de açúcar. Esses micro-organismos, quando presentes nesses ambientes, são capazes de acumular compostos denominados “solutos

compatíveis”, que têm por finalidade repor ou substituir a água das células, restaurar o volume celular e permitir com que as enzimas continuem suas atividades metabólicas e garantir a manutenção das funções celulares. Em ambientes com alta pressão osmótica, as leveduras não conseguem transportar água ativamente para o interior das células, sendo assim elas sintetizam e previnem a perda de “solutos compatíveis”, a fim de manter a atividade de água no citosol, mesmo baixa, porém compatível (WALKER, 2000).

Dentre os osmólitos (solutos compatíveis) produzidos, o glicerol é o mais comum, entretanto, outros alcoóis como arabitol, eritritol, xilitol e manitol, também apresentam estas funções (BROWN, 1978; ONISH, 1963, FIGUEROA & LUCCA, 2001, WALKER 2000). Nickerson & Carroll (1945) foram os primeiros pesquisadores que constataram a formação do glicerol em leveduras (WANG *et al.*, 2001). Após o choque osmótico da célula no meio, ocorre um rápido aumento na formação de glicerol 3 fosfato desidrogenase (Gpd1) dependente de NAD⁺, resultando em numa elevada formação de glicerol.

O *Aureobasidium pullulans* é também singularmente conhecido, no campo da biotecnologia, por ser produtor de biopolímeros, como a pululana, um polissacarídeo biodegradável extracelular, composto por ligações α -1-6 maltotriosil e, em números menores, α -1-4 maltotetraosil, a partir do seu cultivo em substratos a base de glicose e maltose, e a glucana, polímero com ligações do tipo α -1,4-D-, β -1,6-D- e β -1,3-D-entre glicoses, produzido especialmente pela *A.pullulans* var. *aubasidani* Yurlova (ZALAR *et al.*, 2008). Outra aplicação biotecnológica para esse micro-organismo está na produção de enzimas hidrolíticas como a amilase (BARNNET *et al.*, 1999).

Os biopolímeros ocupam um lugar de destaque do atual mercado mundial, por serem alternativas aos materiais plásticos derivados de petróleo. A pululana e a glucana vêm sendo

utilizada pelas indústrias de alimentos e farmacêuticas, possuindo uma grande importância comercial, podendo ser utilizados como polímeros para empacotar alimentos e medicamentos (ZALAR *et al.*, 2008; SINGH & SAINI, 2008)

8.2. *Bacillus sp.*

O *Bacillus* é um micro-organismo muito utilizado industrialmente, pois além de se enquadrar nas principais características desejadas para os agentes microbianos nos bioprocessos como apresentar alta taxa de conversão de substrato em produto, estabilidade, ser de fácil manipulação, resistente às altas temperaturas e às altas concentrações de substratos, a espécie *B. subtilis* está entre os micro-organismos considerados GRAS (General Recognized as Safe), garantindo a segurança para a produção de alimentos e enzimas de uso alimentar. O gênero *Bacillus* é ubíquo e de fácil proliferação, devido a seus esporos resistentes, podendo colonizar ambientes diversos como alimentos, mel, animais, insetos, entre outros (ESAWY *et al.*, 2011).

É um micro-organismo produtor de polímeros como a levana, a qual atualmente tem sido estudada como promotora do sistema imunológico, demonstrando atividades antitumorais (YOON *et al.*, 2004) e antivirais (ESAWY *et al.*, 2011), além de possuir as propriedades de um carboidrato prebiótico já discutidas.

O *Bacillus* também é muito utilizado na produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos como as amilases, glucanases, dextranases, (ANVISA-RDC Nº 205), biosurfactantes, entre outras substâncias (ANDRADE, SIMIQUELI & PASTORE, 2011; SILVA, BASSO & PASTORE, 2011; ESAWY *et al.*, 2011; MATULOVÁ *et al.*, 2011; SHIH, CHEN & WU, 2010).

9. Biotransformação da sacarose e síntese de produtos

Os processos de biotransformação ou fermentação, assim denominados, são métodos que utilizam células íntegras como biocatalisador, em que os produtos de interesse são obtidos em uma única etapa. Quando utilizados em bioprocessos dependentes de enzimas, estes podem ser realizados eliminando as etapas de crescimento do micro-organismo e produção da enzima, separação e purificação, eliminando custos de processamento (BUCHHOLZ & SEIBEL, 2008). Contudo, é de suma importância manter a viabilidade celular, já que os produtos a serem formados requerem a regeneração de coenzimas, presença da cadeia respiratória, das vias metabólicas geradoras de intermediários e outros mecanismos inerentes às células vivas (PRADELLA, 2001).

Segundo Buchholz & Seibel (2008) nos últimos anos, o processo de biotransformação, denominados na literatura como “whole cells biocatalysis”, vêm sendo utilizado em substituição ao tradicional processo de “Reischstein” para a síntese de vitamina C, que anteriormente consistia em diferentes etapas químicas e hoje é realizado em apenas uma, utilizando micro-organismos geneticamente modificados.

Para a produção de FOS o processo de biotransformação foi ainda pouco explorado, uma vez que há a necessidade das células se manterem viáveis no meio com altas pressões osmóticas (NING *et al.*, 2010; NING *et al.*, 2012).

Ning *et al.* (2012) trabalhou com a levedura *Xanthophyllomyces dendrohous* em processo de biotransformação da sacarose, contendo inicialmente 400 g/L desse substrato. O estudo evidenciou que a síntese de neofruooligossacarídeos foi maior com células livres em comparação às células imobilizadas. Além disso, esse trabalho mais uma vez comprovou que a concentração

de sacarose no meio influenciou positivamente o processo, mostrando a necessidade de se trabalhar com micro-organismos osmofílicos.

Domingues *et al.* (2012) realizou um estudo de otimização de conversão de sacarose utilizando células íntegras de *Aureobasidium pullulans*, e alcançou valores de conversão da sacarose em frutooligossacarídeos de 64,6%, ressaltando a importância desse método na diminuição de custos operacionais e de tempo de processo.

Apesar de poucos trabalhos envolverem métodos de biotransformação da sacarose em FOS, existem diversos processos biotecnológicos que envolvem a biotransformação de carboidratos utilizando células íntegras de micro-organismos como *Pichia*, *Zigophicia*, *Torulopsis*, *Aureobasidium* e *Candida*, na produção de eritritol (LIN *et.al.*, 2001), produção de galactooligossacarídeos por *Pseudozyma tsukubaensis* (FAI *et al.*, 2011), produção de isomaltulose por *Serratia plymuthica* (KAWAGUTI & SATO, 2010), *Zygosaccharomyces* e diferentes leveduras osmofílicas correlacionadas à produção de eritritol, arabitól, manitol, glicerol, entre outras (FIGUEROA & LUCCA, 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção biotecnológica de ingredientes funcionais vem ganhando espaço uma vez que existe a demanda crescente por alimentos que apresentem propriedades funcionais. Dentre estes os FOS são os oligossacarídeos prebióticos mais consumidos e comercializados no mercado global e a pesquisa por processos eficientes para a síntese desses produtos faz-se primordial. Neste contexto, a biotransformação da sacarose por micro-organismos osmofílicos se mostra uma alternativa economicamente viável para diminuir tempo e custos de processo, uma vez que elimina as etapas de produção e purificação enzimática, permitindo a síntese desses compostos

em apenas uma única etapa de processamento. A utilização de micro-organismos osmofílicos vem a preencher uma lacuna ainda pouco explorada, haja visto que estes micro-organismos apresentam um alto potencial de aplicação industrial para a produção de FOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-OLIVEIRA, E.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase. **Current Chemical Biology**, v.6, n.1, p. 42-52, 2012.

ALBAYRAK, N.; YANG, S.T. Production of galactooligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, n.1, p.8-19, 2002.

ALMÉCIGA-DÍAZ, C.J. *et al.* Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. **Gene**, v. 484, p.26-34, 2011.

AL-SHERAJI, *et al.* Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, in press, 2013.

ALVARO-BENITO, M. *et al.* Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p.75-81, 2007.

ANDRADE, C. J. ; SIMIQUELI, A. P. R. ; PASTORE, G. M. Production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* with addition of glycerol from biodiesel production in the culture medium. In: 11th INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 2011, Atenas, Grécia. ICEF11 Proceedings, 2011.

APOLINARIO, A.C. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 368-378, 2014.

BARNETT, C. *et al.* Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p.203-209, 1999.

BARTHOMEUF,C.; POURRAT, H. Production of high-content fructo-oligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p.57-64, set. 1995.

BARROS, F.F.C. *et al.* Optimization of the production of a *Bacillus subtilis* biosurfactant using response surface method. **Journal Of Biotechnology**, v. S131, p.S173, 2007.

BEKERS, M. *et al.* Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p.701-706, 2002.

BEGHIN-MEIJ, 2013. Disponível em <<http://www.beghin-meiji.com/uk/home.php>>. Acesso em 15 de outubro de 2013.

BETORET, E. *et al.* Functional foods development: Trends and Technologies. **Trends In Food Science And Tecnologie**, v. 22, p.498-508, 2011.

BICAS, J.; SILVA, J.C.; DIONÍSIO, A.P. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p.7-18, 2010.

BLANCH, M. *et al.* Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. **Food Chemistry**, Sbo, v. 129, n. , p.724-730, 2011.

BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; SILVA, M.V.A.S.; FERREIRA-LEÃO, V.S.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. **Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil**. Em *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008.

BORÉM, A. A história da Biotecnologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.34, p. 10-12, 2005.

BORZANI, W. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial v.1: Fundamentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. 254 p.

BROWN, A. D. *et al.* Microbial Water Stress. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n.4 , p.803-843, 1976.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J.. Industrial carbohydrate biotransformations. **Carbohydrate Research**, v.343 , p.1966-1979, 2008.

BYUN, S.H. *et al.* Production of fructo-oligosaccharides from sucrose by two levansucrases from *Pseudomonas aurantiaca* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. S131, p.S112, 2007.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M., **Alimentos para Fins Especiais: Dietéticos**, 423p., São Paulo: Varela, 1996.

CBD., 2000. Cartagena protocol on biosafety to the convention on biological diversity. Available at <http://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf>. Accessed on 06/21/09.

CHATTERTON, N. J. *et al.* Dynamics of Fructan and Sucrose Biosynthesis in Crested Wheatgrass. **Plant And Cell Physiology**, v. 29, n. 7, p.1103-1108, 1988.

CHEN, J. Biochemical characterization of an intracellular 6 G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and its use in production of neo-fructooligosaccharides (ne-FOSs). **Bioresource Technology**, v. 102, p.1715-1721, 2011.

CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme And Microbiol Technology**, v. 29, p.252-257, 2001.

DELGADO, G.C.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; PASTORE, G.M. Immunomodulatory effects of fructans. **Food Research International**, Sbo, v. 43, n. , p.1231-1236, 2010.

DORTA, C. *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus* FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiol Biotechnol**, v. 33, p.1003–1009, 2006.

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.16, p.334-339, 1994.

DIONÍSIO, A.P. *et al.* Cleavage of β -carotene for microorganisms isolated in Brazil - A production of β -ionone. **Journal of Biotechnology**, v. S131, p.S167, 2007.

DOMINGUEZ, Ana. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1174-1179, 2012.

EAGLES, C. F. Variation in the soluble carbohydrate content of climatic races of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) at different temperatures. **Annals of Botany**, v.31, p.645–651, 1967.

ESAWY *et al.* Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.823-820, 2011.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrases from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32, n.3, p.237-243, 1997.

FAI, A. E. C. ; SIMIQUELI, A. P. R. ; GHISELLI, G. ; PASTORE, G. M. . Production of galactooligosaccharides and biosurfactants by *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater as an alternative medium. In: 11 th International Congress on Engineering and Food (ICEF 11), 2011, Athens, Greece. 11 th International Congress on Engineering and Food (ICEF 11), 2011.

FIALHO, M. B. *et al.* Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. **Mycoscience**, v. 54, p.198-205, 2013.

FIGUEROA, L. I. C.; LUCCA, M. E. Production of polyols by osmotolerant yeasts. **Methods in Biotechnology**, v. 14, p.233-241, 2001.

FURUZAWA, C. *et al.* Systems Metabolic Engineering: The Creation of Microbial Cell Factories by Rational Metabolic Design and Evolution In: ZHONG, Jian-Jiang *et al.* **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Future Trends in Biotechnology**. Shangai: Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2012. Cap. 1, p. 25-62

GHAZI, I. *et al.* Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p.204-211, 2007.

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.

GUIO, F. *et al.* Kinetic modeling of fructooligosaccharide production using *Aspergillus oryzae* N74. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 167, p.142-163, 2012.

HAYASHI, S. *et al.* Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p.1465-1469, 2000.

HSIEH, Y.H.P & OFORI, J.A. Advances in Biotechnology for the Production of Functional Foods. In: BAGCHI, D.; LAU, F. C.; GHOSH, D. K. (Ed.). **Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals**. Tokio: CRC Press, 2011. Cap.1, 591 p.

HUANG, W.C.; TANG, I.C. Cap.8. Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In: YANG, Shang-tian (Org.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Dublin: Elsevier B.V, 2007. p. 185-223.

JOGLEKAR, R *et al.* **Biotechnology in industry: selected applications and unit operations**. Michigan: Ann Arbor Science, 1983. 179 p.

JUNG, K. H., *et al.* Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**. v.9, p. 703-708, 1987

KATAPODIS, P., *et al.* Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.378–382, 2004.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Isomaltulose production by free cells of *Serratia plymuthica* in a batch process. **Food Chemistry**, v. 120, p. 789–793, 2010.

KRITZINGER, S.M. *et al.* The effect of production parameters on the synthesis of the prebiotic trisaccharide, neokestose, by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Enzyme And Microbial Technology**, v. 32, p. 728–737, 2003.

KUNCIC, M. K. *et al.* Morphological responses to high sugar concentrations differ from adaptation to high salt concentrations in the xerophilic fungi *Wallemia spp.* **British Mycological Society**, Sbo, v. 117, p.466-478, 2013.

LAERE, A. V.; ENDE, V.D. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. **Plant, Cell And Environment**, v. 25, p.803-813, 2002.

LI, H. *et al.* Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. **Enzyme And Microbial Technology**, v.40 p. 1006–1012, 2007.

LIN, S. J. *et al.* Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1249–1258, 2001.

LINDE, D.. Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 109, p.123-130, 2012.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed.: Benjamin Cummings, 2011. 1043 p.

MADLOVA, A. *et al.* Biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides: the choice of microorganisms and optimization of process conditions. **Food Biotechnology**, v. 17, p.151-155, 2008.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p.287-298, 2004.

MARKOSYAN, A. A. *et al.* Production of fructooligosaccharide syrup from sucrose in combination with palatinose and trehalose. **Applied Biochemistry And Microbiology**, v. 43, n. 4, p.383-389, 2007

MATULOVÁ, M. NMR structural study of fructans produced by *Bacillus sp.* 3B6, bacterium isolated in cloud water. **Carbohydrate Research**, v. 346, p.501-507, 2011.

MAUGERI, F. & HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 43–49, 2007.

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.187-192, 1995.

MOON, H. J. *et al.* Biotechnological production of erythritol and its applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86 n. , p.1017-1025, 2010.

MUSSATTO, S.I. *et al.* Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p.76–81, 2009.

MUTANDA, T.; WILHELMI, B.S.; WHITELEY, C.G. Response surface methodology: Synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 43, p.362-368, 2008.

NEMUKULA, A. *et al.* Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2040-2045, 2009.

NICKERSON, W.J. & CARROLL, W.R. On the metabolism of *Zygosaccharomyces*. **Archives of Biochemistry**, v.7, p. 257-71, 1945.

NING *et al.* Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cellbiotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7472-7478, 2010.

NING *et al.* Low-cost production of 6^G-fructofuranosidase with high value-added astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.104, p. 660-667, 2012.

ONISH, H. Osmophilic yeasts. **Advances In Food Research**, v. 12, p.53-94, 1963.

PARK, J.P.; OH, T.K.; YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, p.471-476, 2001.

PASSOS, L.M.L e PARK, Y.K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PEREIRA JUNIOR, N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Séries em Biotecnologia**, v.1. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, Willibaldo *et al.* Biotecnologia Industrial. São Paulo,SP: Edgard Blücher, 2001. v.2, cap. 16, p. 355-372.

RAY, M. J.; DICKINSON, D. J.; BUCK, M. *Aureobasidium* or *Hormonema*? A Genetic Approach. In: **35th ANNUAL MEETING LJUBLJANA**, Slovenia, 2004. 10 p.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, S2, p.S105-S110, 2013.

ROZEN, R., STEINBERG, D., BACHRACH, G. Streptococcus mutans fructosyltransferase interactions with glucans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 39-43, 2004.

SANCHEZ, O. *et al.* Fructooligosaccharides production by *Aspergillus sp.* N74 in a mechanically agitated airlift reactor. **Food And Bioproducts Processing**, 86, p.109-115, 2008.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v.39, p.753-758, 2004.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends In Food & Technology**, v. 16, p.442-457, 2005.

SANTOS, A.M.P.; OLIVEIRA, M.G. & MAUGERI, F. Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor desing. **Bioresources Technology**, 98, 3142-3148, 2007.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R. ; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 682-689, 2009.

SALAZAR, N. *et al.* Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 135, p.260-267, 2009.

SCARR, M. P., and D. ROSE. Study of osmophilic yeasts producing invertase. **Journal of General Microbiology**, v.45, p. 9-16. 1966.

SILBIR *et al.* Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p. 454-461, 2014.

SINACORI, M. *et al.* Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. **Food Microbiology**, in press, 2013.

SINGH, R.S.; SAINI, G.K. Pullulan-hyperproducing color variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1 newly isolated from phylloplane of *Ficus* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3896-3899, 2008.

SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v.18, p. 458–465, 2008.

SHEU, D.C. *et al.* Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 23, p.1499-1503, 2002.

SHIH, I.L.; CHEN, L.D.; WU, J.Y. Levan production using *Bacillus subtilis natto* cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p.111-117, 2010.

SHIMIDELL, W. Micro-organismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHIMIDELL, W *et al.* (Coord.). **Biociologia Industrial**: volume 2. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. Cap. 2, p. 5-18.

SILBIR, S. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, in press, 2014.

SILVA, J. B. ; BASSO, L. C. ; PASTORE, G.M. Avaliação dos parâmetros de produção de frutooligosacarídeos de cadeia longa a partir da biotransformação da sacarose pela linhagem de *Bacillus sp.* In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul.

SILVA, J.B. *et al.* Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. **Procedia Food Science**, v. 1, p.1547-1552, 2011.

SINACORI, M., *et al.*, Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin, *Food Microbiology*, In press, 2013.

STRAATHOF, A. J.J.; KIEBOOM, A. P.G.; BEKKUM, H. V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, n.146, p.154-159, 1986.

TAKEDA, H. Production of 1-Kestose by *Scopulariopsis brevicaulis*. **Journal of Fermentation And Bioengineering**, v. 77, n. 4, p.386-389, 1994.

TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p.483-490, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. 8ª edição, 1ª reimpressão, Artmed, Porto Alegre, 2006.

TRUJILLO, L.E. *et al.* Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, n.2-3, p.139-144, fev.2001.

VEGA-PAULINO, R.J.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p.44-51, 2012.

VIJN & SMEEKENS. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v. 120, p.351-359, 1999.

WALKER, G. M. **Yeast: Physiology and Biotechnology**. London: Wiley, 350 p., 2000.

WANG, Z.X. *et al.* Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**. v.19, p. 201–223, 2001.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, Germany, v. 42, p.8-12, 2009.

YOON *et al.* Effect of levan's branching structure on antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p.191-194, 2004.

YOSHIKAWA, J., *et al.* Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.535–539, 2008.

YU, P.L. **Fermentation Technologies – Industrial Applications**. Elsevier Applied Science. London, England and New York, EUA. 444 p. 1990.

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

YUN, J. W.; SONG, S. K.. Enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. In: BUCKE, Christopher (Comp.). **Carbohydrate Biotechnology Protocols: Methods in Biotechnology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999. Cap. 12, p. 141-152

ZALAR, P. *et al.* Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies In Mycology**, v. 61, p.21-38, 2008.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE PELA LINHAGEM DE *BACILLUS SP.*

Artigo a ser submetido ao periódico Carbohydrate Polymers

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA E CURTA A PARTIR DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE PELA LINHAGEM DE BACILLUS SP.

RESUMO

Os efeitos dos parâmetros da produção de frutooligossacarídeos de cadeia longa através da biotransformação da sacarose pela linhagem de *Bacillus sp.* foram avaliados pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), precisamente pelo método do Plackett-Burman Design com 12 variáveis independentes em seus respectivos níveis de estudo: concentração da sacarose (%): 20 - 40; inóculo (%) 1-20, extrato de levedura (%): 0-0,5; uréia (%): 0 - 0,1; K_2HPO_4 (%): 0 - 0,0435; $(NH_4)_2SO_4$ (%): 0 - 0,01; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%): 0 - 0,01; $ZnSO_4$ (%): 0,0015; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (%): 0 - 0,001, pH: 5,0 - 7,0; temperatura (°C): 30 a 37; agitação (rpm): 150 a 250. Os efeitos das variáveis foram estimados para o parâmetro dependente “valor de área de frutooligossacarídeos de cadeia longa”, obtidos por análise de cromatografia líquida de alta eficiência, significando que quanto maior o valor da área, maior a quantidade de frutooligossacarídeo produzido. As variáveis significativas para este processo foram pH e agitação e a concentração de sulfato de zinco, apresentando efeitos negativos e extrato de levedura e sulfato de amônia, que apresentaram efeitos positivos. A presença de uma mistura de frutooligossacarídeos, compostos por GF₂ a GF₁₁, foi constatada por meio da análise de espectrometria de massas.

1. INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos pertencem ao grupo dos ingredientes prebióticos que são “oligossacarídeos não digeríveis”, porém fermentáveis pelas bactérias presentes na microbiota intestinal. Promovem seletivamente o crescimento das bactérias benéficas, como os lactobacilos e as bifidobactérias, gerando uma série de benefícios à saúde humana como estímulo do sistema imunológico, manutenção da microbiota intestinal saudável, resistência contra patógenos, aumento da absorção de minerais, síntese de vitaminas do complexo B, diminuição do colesterol sérico e prevenção contra a formação de tumores carcinogênicos (GIBSON & ROBERFROID, 1995; DELGADO *et.al.*, 2010).

Os oligossacarídeos de frutose apresentam diferenças entre os tamanhos moleculares e entre o tipo de ligação presente entre os grupamentos frutossil de sua molécula. Os mais comuns são os do tipo 1^F, contendo ligações do tipo β -2-1 entre as frutoses tendo uma molécula de sacarose na fase terminal *foramndo* 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) and 1^F fructofuranosil-nistose (GF₄). Entretanto os neofruutooligossacarídeos (NeoFOS), são classificados com 6^G, por possuírem ligações do tipo β -2,6 entre unidades de frutose e glicose, denominados neokestose (GF₂), neonistose (GF₃) e neofrutofuranosilnistose (GF₄). Já os do tipo 6^F possuem ligações osídicas do tipo β -2,6 entre unidades de frutose, sendo os mais conhecidos são 6-kestose (GF₂), 6-nistose (GF₃) e 6-frutofuranosilnistose (GF₄) (YUN & SONG, 1999; STRAATHOF *et al.*, 1986).

As moléculas maiores são polissacarídeos de frutose denominados frutanas, e podem conter de 11 a 55 graus de polimerização. Podem conter ligações do tipo β 2-1, denominadas inulinas ou do tipo β -2-6, denominadas levanas (YUN & SONG, 1999; STRAATHOF *et al.*, 1986).

Muitas espécies de bactérias são capazes de produzir levanas pela ação da enzima levansucrase, produzir polissacarídeos de inulina pela ação da inulosucrase e também frutooligossacarídeos, tanto de cadeia curta, de até 4 graus de polimerização, como os de cadeia longa (cl-FOS), contendo até 10 graus de polimerização, pela ação de ambas as enzimas (GHALY *et al.*, 2007; KIM *et al.* 1998, PARK *et al.*, 2001). Dentre as bactérias o *Bacillus sp.* é um dos micro-organismos capazes de produzir todos os tipos citados (MATULOVÁ *et al.*, 2011).

Estas enzimas usam a sacarose como aceptoras e doadoras de frutose. A seletividade de transferência de frutose e de hidrólise da sacarose depende da fonte da enzima, da temperatura e da concentração inicial de sacarose, entre outros parâmetros. (KIM *et al.*, 1998; OHTSUKA *et al.*, 1992; JANG *et al.*, 2001, KORAKLI *et al.*, 2003).

A síntese de FOS pode ser realizada utilizando células microbianas íntegras, capazes de biotransformar a sacarose sintetizando o produto em uma única etapa, evitando assim, a etapa de produção e purificação da enzima (NING *et al.*, 2010; SHIH *et al.*, 2010).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os principais fatores intrínsecos ao processo de biotransformação da sacarose pela linhagem de *Bacillus sp.*, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta, mais precisamente pelo planejamento de Plackett-Burman e também caracterizar os frutooligossacarídeos produzidos por esta linhagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo

O *Bacillus sp.*, micro-organismo utilizado neste estudo, foi previamente isolado de favo-de-mel e identificado pelo sequenciamento do DNA ribossômico 16S, cuja sequencia foi

disponibilizada no banco de dados GenBank com o número de acesso GQ246204, em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa.

A cultura do *Bacillus sp.* foi mantida em tubos inclinado em meio PCA sólido, contendo contendo triptona 0,5% (p/v), extrato de levedura 0,25% (p/v), dextrose 0,1%, ágar 1,5% e periodicamente a cultura foi reativada e novamente armazenada em tubo inclinado contendo meio PCA.

Para o cultivo do inóculo, uma alçada de células da cultura mantida em tubo inclinado, foi inoculada em 3 mL de meio PCA caldo a 30°C por 24h. Após o crescimento, a cultura foi transferida para 150 mL de meio PCA caldo e incubados por 24 horas, 150 rpm a 30°C.

A suspensão celular foi centrifugada a 17.000 x g por 15 minutos e a biomassa úmida obtida em condições de assepsia, foi utilizada para o inóculo inicial de acordo com a estratégia do Plackett-Burman para cada tratamento.

2.2. Plackett-Burman

A biotransformação de sacarose em FOS foi realizada em frascos de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultura com composição variando de acordo com o planejamento, assim como a concentração do inóculo, e as condições experimentais de temperatura e agitação. As amostragens foram realizadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de experimento.

Para este planejamento, foi utilizado um PB-16 para avaliar 12 parâmetros e seus efeitos, com 16 tratamentos e adição de 3 pontos centrais para estimar o erro experimental. Os parâmetros avaliados e seus níveis de variação estão descritos na Tabela 1. Na Tabela 2 estão apresentados a matriz do experimento juntamente com os resultados obtidos.

Tabela 1. Códigos e níveis dos fatores do experimento de Plackett-Burman do processo de biotransformação de sacarose pelo *Bacillus sp.*

<i>Variáveis Independentes</i>		<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
<i>X1</i>	<i>Sacarose (%)</i>	20	30	40
<i>X2</i>	<i>Inóculo (%)</i>	1	10,5	20
<i>X3</i>	<i>pH</i>	5	6	7
<i>X4</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	30	33,5	37
<i>X5</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	150	200	250
<i>X6</i>	<i>Extrato de levedura (%)</i>	0	0,25	0,5
<i>X7</i>	<i>Uréia (%)</i>	0	0,05	0,1
<i>X8</i>	<i>K₂HPO₄ (%)</i>	0	0,0218	0,0435
<i>X9</i>	<i>(NH₄)₂SO₄ (%)</i>	0	0,005	0,01
<i>X10</i>	<i>MgSO₄.7H₂O (%)</i>	0	0,005	0,01
<i>X11</i>	<i>ZnSO₄.7H₂O (%)</i>	0	0,0008	0,0015
<i>X12</i>	<i>MnSO₄.7H₂O (%)</i>	0	0,0005	0,001

Um experimento controle, nas condições do ponto central, foi conduzido sem o inóculo microbiano para demonstrar a manutenção no teor de sacarose e não formação de FOS.

2.3. Análise dos FOS produzidos

2.3.1. Análise por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras coletadas durante o processo foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à inativação enzimática em banho-maria a 100°C por 10 minutos. As amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em filtros com porosidade 0,22 µm para a análise.

As análises dos carboidratos foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo Waters 600 E, com um detector de índice de refração, Waters 410 IR, coluna Shodex Ionpack KS-801, da Waters, volume de injeção de 10

μL , tendo água a 75°C como fase móvel e fluxo de 1 mL/min . Foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose da marca Sigma e de frutooligossacarídeos kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil-nistose (GF_4) da Wako Pure Chemicals.

A quantidade dos FOS produzidos, não identificados com os padrões acima mencionados, foi estimada através da área do pico cromatográfico, devido à inexistência de padrões FOS com maior grau de polimerização acima do GF_4 . Este composto foi denominado FOS de cadeia longa (cl-FOS). A identidade deste composto foi determinada por espectrometria de massa, conforme descrito no item 2.3.2.

2.3.2. Análise por espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas foi utilizada para identificar molecularmente as substâncias detectadas por cromatografia, cujos padrões cromatográficos não estão disponíveis. Sendo assim, o pico de FOS foi coletado na saída do detector de índice de refração, utilizado na análise de cromatografia, conforme descrita no item 2.3.1., e então, a substância foi analisada por espectrometria de massas.

O microequipamento utilizado foi do tipo QTOF, o qual consiste em um espectrômetro de massas equipado com analisadores do tipo híbrido quadrupolo (Q) e “tempo-de voo” (TOF) da Micromass (Waters), com uma interface eletrospray (LC-ESI-MS-MS). O controle do instrumento e processamento de dados foi conduzido através do software Masslynx 4.0.

As condições da análise foram: ionização eletrospray (ESI) em modo positivo de operação com voltagem capilar de 2500 V , voltagem da amostra no cone de 85 V , voltagem de extração no cone de 3.0 V , fonte de temperatura de 120°C , temperatura de dessolvatação de 300°C , e fluxo de gás no cone de 500 L.h^{-1} e taxa de seringa de $20\text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. A energia iônica do Quadrupolo foi de

2.0 V e energia de colisão de 4.0 V. Para o TOF a voltagem do tubo foi de 5630 V e a voltagem do analisador MCP foi de 2700 V.

2.4. Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA), considerando como resposta a área do pico de FOS de cadeia longa (cl-FOS) produzido, já que foi o único composto produzido, quando analisado por CLAE. O nível de significância utilizado no planejamento foi de 10% (p-valor < 0,1). Este valor foi definido por considerar a variabilidade experimental intrínseca aos processos biológicos que envolvem micro-organismos e enzimas e também por se tratar de uma metodologia utilizada para selecionar variáveis (Rodrigues e Iemma, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise dos FOS produzidos

Os FOS produzidos neste trabalho foram analisados primeiramente por CLAE, cujo cromatograma foi observado um pico simétrico, conforme a Figura 1, sugerindo ser um composto puro de FOS com maior tamanho molecular em comparação aos padrões GF₂, GF₃ e GF₄. Sendo assim, foi denominado FOS de cadeia longa (cl-FOS).

Esta evidência se confirma, uma vez que a coluna cromatográfica KS-801 separa os compostos por tamanho molecular na ordem decrescente, e o tempo de retenção deste composto foi de 4,5 minutos, mostrando-se menor que o tempo de retenção de 4,99 minutos do maior padrão de FOS analisado (GF₄).

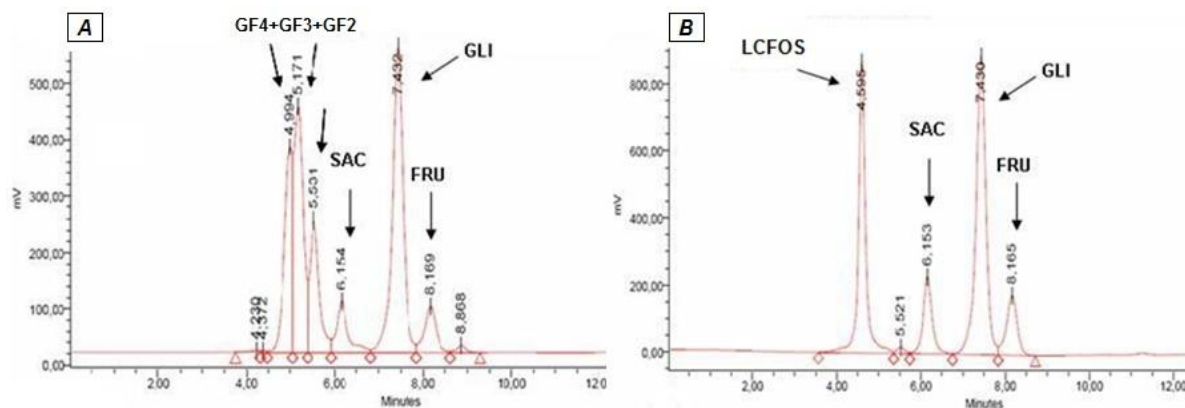


Figura 1: A- cromatograma contendo padrões de GF₂, GF₃ e GF₄, glicose, frutose e sacarose. B- cromatograma da amostra de FOS de cadeia longa produzido pela inagem de *Bacillus sp.*

Entretanto, a análise por espectrometria de massas mostrou conter moléculas de FOS de até 10 graus de polimerização. O espectro de MS apresentou a presença de um grupo de FOS composto por: GF₂, GF₃, GF₄, GF₅, GF₆, GF₇, GF₈, GF₉, GF₁₀, GF₁₁. Isso possivelmente ocorreu por meio de um arrastamento, na coluna cromatográfica, dos oligossacarídeos menores pelos de maior tamanho molecular, formando um pico simétrico no cromatograma.

A massa molecular observada dos oligossacarídeos pela análise de MS, apresentou todos os oligossacarídeos contendo um átomo de sódio substituindo um átomo de hidrogênio (GF_nNa⁺), uma vez que o sódio é contaminante comum desta análise. Sendo assim a massa exata (m/z) de cada um dos FOS (GF_nNa⁺), foi de: 527,1591; 689,2112; 851,2626; 1013,3209; 1175,3618; 1337,4230; 1499,4730; 1661,5254; 1823,5842 e 1985,7079 para o GF₂ ao GF₁₁, respectivamente.

O resultado da análise de MS está ilustrado na Figura 2. A presença de cada composto é confirmada comparando o espectro de cada íon formado com o seu respectivo modelo isotópico, conforme exemplificado pelo GF₅, pela Figura 3.

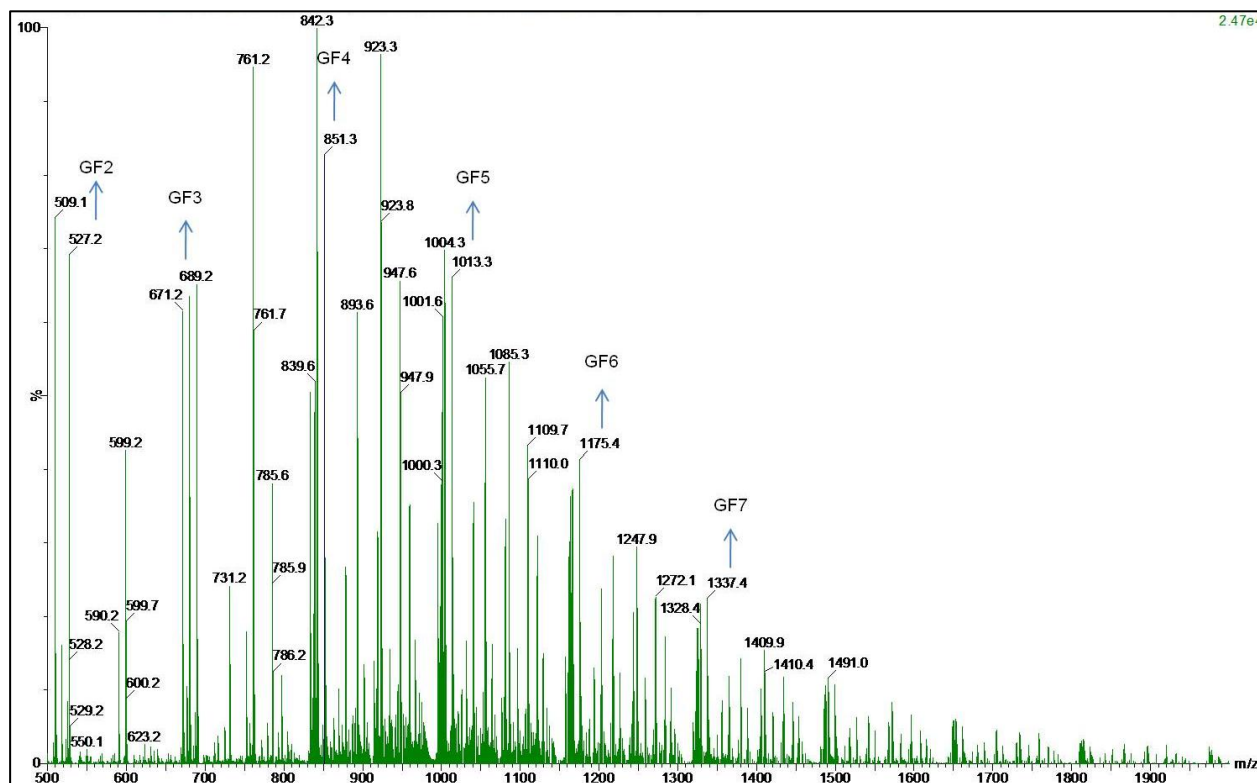


Figura 2: Espectrograma de massas dos íons *formados* pela análise da amostra do pico de lc-FOS produzido pela biotransformação da sacarose pelo *Bacillus sp.*

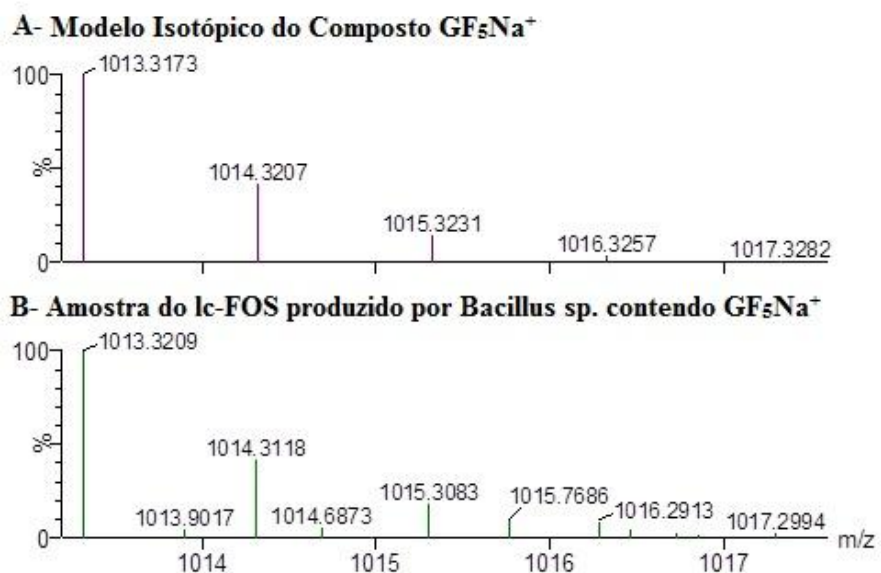


Figura 3: A- espectro de íons do modelo isotópico do GF₅, com fórmula molecular de, C₃₆H₆₁O₃₁Na. B- espectro de íons obtido pela amostra lc-FOS, produzido pelo *Bacillus sp.* Note que um átomo de sódio está substituindo um átomo de hidrogênio da amostra.

3.2. Plakett-Burman

O planejamento dos experimentos e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2, que incluem apenas os valores correspondentes às 24 e 48 horas de processo, pois são os tempos com máximos valores de síntese.

Tabela 2: Matriz do Plackett-Burman (PB16) e área de cl-FOS obtida por CLAE após 24 e 48 horas de incubação do processo de biotransformação da sacarose pelo *Bacillus sp.*

Tratamento (T)	Variáveis ou Fatores												Área cl-FOS *(10 ⁶) 24h	Área cl-FOS *(10 ⁶) 48h
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12		
1	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	0	0
2	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	257	408
3	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	49,3	88,7
4	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	242	91,4
5	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	110	71,0
6	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	60,2	9,93
7	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	93,1	44,2
8	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	11,9	8,78
9	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	166	234
10	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	42,3	3,93
11	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-1,0	233	240
12	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0	0
13	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,0	0	0
14	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	213	213
15	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	1,0	230	231
16	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	171	260
PC1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	265	209
PC2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	300	199
PC3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	283	204

Nota: X1: sacarose (%; m/v); X2: inóculo (% b.u./v); X3: pH; X4: temperatura (°C); X5: agitação (RPM); X6: extrato de levedura (%; m/v); X7: uréia (%; m/v); X8: K₂HPO₄ (%; m/v); X9: (NH₄)₂SO₄ (%; m/v); X10: MgSO₄.7H₂O (%; m/v); X11: ZnSO₄.7H₂O (%; m/v); X12: MnSO₄.7H₂O (%; m/v).

Os resultados apresentados demonstraram que o melhor tratamento para a síntese foi o tratamento 2 e em seguida os pontos centrais. Devido aos pontos centrais concentrarem os maiores resultado, foi necessário checar a curvatura para verificar os efeitos das variáveis.

A análise estatística dos resultados e o cálculo dos efeitos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Estimativa dos efeitos dos parâmetros analisados após 24 e 48 horas de biotransformação da sacarose pelo *Bacillus sp.*

<i>Fator</i>	<i>Time (h)</i>	<i>Efeito Área de Cl-FOS *10⁶</i>	<i>EP Área de Cl-FOS *10⁶</i>	<i>t (6)</i>	<i>p- valor</i>
<i>Média</i>	24	117	13,2	8,88	<0,001
	48	119	10,2	11,7	<0,001
<i>Curvatura</i>	24	330	66,6	4,96	0,004
	48	170	51,2	3,32	0,021
<i>X1</i>	24	-38,2	26,5	-1,44	0,209
	48	-28,0	20,3	-1,37	0,229
<i>X2</i>	24	5,10	26,5	0,19	0,855
	48	-3,00	20,3	-0,13	0,899
<i>X3</i>	24	5,60	26,5	0,21	0,841
	48	-56,0	20,3	-2,77	0,040
<i>X4</i>	24	48,7	26,5	1,84	0,125
	48	-8,00	20,3	-0,38	0,721
<i>X5</i>	24	-156	26,5	-5,88	0,002
	48	-203	20,3	-10,0	<0,001
<i>X6</i>	24	23,8	26,5	0,90	0,410
	48	51,0	20,3	2,53	0,052
<i>X7</i>	24	-33,1	26,5	-1,25	0,266
	48	-32,0	20,3	-1,57	0,177
<i>X8</i>	24	-3,40	26,5	-0,13	0,902
	48	-36,0	20,3	-1,76	0,139
<i>X9</i>	24	20,5	26,5	0,78	0,474
	48	54,0	20,3	2,68	0,044
<i>X10</i>	24	-17,0	26,5	-0,64	0,548
	48	7,00	20,3	0,37	0,729
<i>X11</i>	24	-27,1	26,5	-1,03	0,352
	48	-69,0	20,3	-3,37	0,020
<i>X12</i>	24	31,2	26,5	1,18	0,292
	48	18,0	20,3	0,89	0,415

EP: Erro Padrão. Parâmetros em negrito são estatisticamente significativos para as respostas (p-valor < 0,1), considerando a soma dos quadrados do resíduo (SS residual), para o cálculo. *X1*: sacarose (% m/v); *X2*: inóculo (% b.u./v); *X3*: pH; *X4*: temperatura (°C); *X5*: agitação (RPM); *X6*: extrato de levedura (% m/v); *X7*: uréia (% m/v); *X8*: K₂HPO₄ (% m/v); *X9*: (NH₄)₂SO₄ (% m/v); *X10*: MgSO₄.7H₂O (% m/v); *X11*: ZnSO₄.7H₂O (% m/v); *X12*: MnSO₄.7H₂O (% m/v).

Nas primeiras 24 horas de processo a agitação exerceu um efeito negativo de $-155,5 \cdot 10^6$ e um p-valor de 0,002. Já nas 48 horas, além da agitação que manteve seu efeito negativo com valor de $-203 \cdot 10^6$ e p-valor de 0,0002, o pH e a concentração de $ZnSO_4$ também tiveram esse perfil com valor de efeito de $-56 \cdot 10^6$ e p-valor de 0,039, para o pH, e $-69 \cdot 10^6$ de efeito e 0,02 p-valor para o sulfato de zinco. A concentração de extrato de levedura e sulfato de amônia exerceram um efeito positivo com valor de $51 \cdot 10^6$ e p-valor de 0,053 para o extrato de levedura e $54 \cdot 10^6$ e p-valor de 0,0438 para $(NH_4)_2SO_4$.

Os gráficos de pareto ilustrados pela Figura 4 exibem claramente estes resultados.

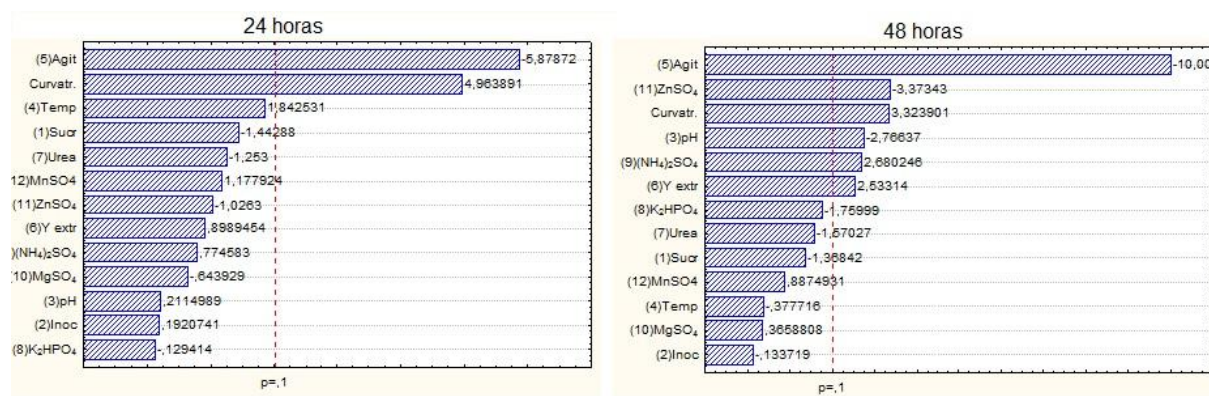


Figura 4: Efeitos estimados (valores absolutos) para cada variável durante o processo de biotransformação da sacarose em FOS por *Bacillus sp.*

Sendo assim, os parâmetros agitação (X5), sulfato de zinco (X11) pH (X3), sulfato de amônia (X9) e extrato de levedura (X6), e foram altamente significativos ao processo de biotransformação da sacarose pela linhagem de *Bacillus sp.*, devendo portanto, serem considerados em estudos posteriores de otimização.

A sacarose, mesmo não apresentando um efeito estatisticamente significativo a 10% de intervalo, exerceu um efeito negativo. Entretanto, em estudos posteriores de otimização este fator deve ser incluso, uma vez que a atividade de transfrutossilacção da enzima, é diretamente influenciada pela concentração da sacarose no meio (CASTILLO *et al.*, 2004).

Shih *et al.* (2010) comparou a síntese de levanas utilizando células livres e imobilizadas de *Bacillus subtilis natto* e concluiu que o cultivo com células livres atingiu máxima produção com 200 g/L de sacarose no meio, apresentando decréscimo de produção quando tanto concentrações maiores quanto menores de sacarose foram utilizadas. Já no processo utilizando células imobilizadas, a concentração de levanas produzidas aumentou com o aumento de sacarose inicial no meio.

A agitação apresentou um efeito negativo explicado pela possibilidade de causar danos celulares quando este parâmetro atingir valores altos.

Os nutrientes analisados, no geral, impactam no metabolismo celular influenciando diversos parâmetros importantes que incluem o crescimento das células, a produção de enzimas, o processo de respiração, viabilidade e tolerância contra estresse. Sendo assim, os minerais que tiveram um efeito negativo deverão ser diminuídas as concentrações, os que exerceram efeitos positivos deverão ser ampliadas as faixas de concentrações e os outros que não apresentaram efeitos deverão ser mantidas as condições do ponto central para estudos posteriores.

A produção de uma mistura de frutooligosacarídeos, contendo ambos FOS de cadeia curta como de cadeia longa, produzidos pelo *Bacillus sp.* nos cultivos deste estudo, apresentou resultados similares com trabalhos descritos na literatura (MATULOVÁ *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2001; KIM, SHOI & YUN, 1998).

Park *et al.* (2001) relata a síntese de GF₅ e GF₆ pela enzima bruta de *Bacillus macerans* em soluções de 50% de sacarose. Em contrapartida, quando a catálise é realizada com a enzima purificada, FOS menores como GF₂, GF₃, são preferencialmente sintetizados. Kim, Shoi & Yun (1998), utilizando a catálise enzimática com frutossiltransferase purificada de outra espécie de *Bacillus macerans* produziu seletivamente GF₄.

Muitos trabalhos científicos relatam a síntese de polissacarídeos de frutose, como frutanas e levanas a partir da frutossiltransferase de *Bacillus subtilis* (SHI *et al.*, 2010; ESAWY *et al.*, 2011; MELLO *et al.*, 2010; CASTILLO & MUNGUÍA *et al.*, 2004). Estes compostos podem ser sintetizados também a partir do cultivo com células livres, atingindo um rendimento em torno de 25% e através de células imobilizadas, com rendimentos descritos de até 46% (SHIH *et al.*, 2010).

Matulová *et al.* (2011) caracterizou por NMR a levana produzida por *Bacillus sp.* a partir da incubação com sacarose, e detectou uma mistura com diferentes compostos, como levanas de 3500 a 100 KDa de tamanho, frutooligossacarídeos de cadeia curta como GF₂, GF₃ e GF₄ e de cadeia longa como GF₅, GF₆ e GF₇.

4. CONCLUSÕES

Mais pesquisas devem ser feitas para avaliar e aperfeiçoar a produção dos frutooligossacarídeos de cadeia longa por *Bacillus sp.* em continuidade aos estudos de otimização de processos. A caracterização dos FOS produzidos, por espectrometria de massas, possibilitou detectar uma mistura contendo de GF₂ a GF₁₁, entretanto as metodologias analíticas utilizadas neste estudo, não permitiu a quantificação desses compostos devido à inexistência de padrões comerciais dos FOS a partir do GF₅, dificultando estimar a quantidade de cada composto

produzido e o rendimento da produção. Este estudo demonstrou que o processo de síntese de FOS por meio da biotransformação a partir de células livres de *Bacillus sp.* é satisfatório e torna-se plausível de ser otimizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTILLO, E., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents . **Journal of Biotechnology**, v.114, p. 209-217, 2004.

DELGADO, G.T.C., TAMASHIRO, W.M.S.C., PASTORE, G.M. Immunomodulatory effects of fructans. **Food Research International**, v.43, p.1231–1236, 2010.

ESAWY, M.A. *et al.* Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p. 823-830, 2011.

GHALY, A. E.; *et al.* Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, p. 47-54, 2007.

GIBSON, G.R., ROBERFROID, M. B. Dietary modulations of the human colonic microbiota – introduction and concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

JANG, K.H., *et al.* (2001). Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 339–343.

KIM, B.W., CHOI, J.W, YUN, J.W. Selective production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p.1031–1034, 1998.

KORAKLI, M. Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 2073–2079, 2003.

MATULOVA, M. *et al.* NMR structural study of fructans produced by *Bacillus sp.* 3B6, bacterium isolated in cloud water. **Carbohydrate Research**, v.346, p.501-507, 2011.

MELO, F.C.B.C *et al.* Levan from *Bacillus subtilis natto*: Optimization of Productivity Using Factorial Design. **Journal of Biotechnology**. v, 150S, p. S1–S576, 2010.

NING, Y.; WANG, J.; CHEN, J.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X. Production of neo fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7472-7478, 2010.

OHTSUKA, K. *et al.* Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1638. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, p. 1373–1377, 1992.

PARK, J.P., OH, T.K., YUN, J.H. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 471-476, 2001.

PARK, J.P., OH, T.K., YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v.37, p.471–476, 2001.

RODRIGUES M.I., IEMMA AF. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 2nd ed. Campinas: Ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

SHIH, I.L., CHEN, L.ID., WU, J.Y. Levan production using *Bacillus subtilis natto* cells immobilized on alginate. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p. 111-117, 2010.

STRAATHOF, A. J.J.; KIEBOOM, A. P.G.; BEKKUM, H. V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, n.146, p.154-159, 1986.

YUN, Jong Won; SONG, Seung Koo. Enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. In: BUCKE, Christopher (Comp.). **Carbohydrate Biotechnology Protocols: Methods in Biotechnology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999. Cap. 12, p. 141-152

CAPÍTULO 3

PARAMETERS EVALUATION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY SUCROSE BIOTRANSFORMATION USING AN OSMOPHILIC *AUREOBASIVM PULLULAN* STRAIN

Artigo publicado no periódico *Procedia Food Science* Volume 1, Pages 1547–1552, 2011.

CAPÍTULO 3

PARAMETERS EVALUATION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY SUCROSE BIOTRANSFORMATION USING AN OSMOPHILIC AUREOBASIDIUM PULLULAN STRAIN

Procedia Food Science Volume 1, 2011, Pages 1547–1552.

RESUMO

“Avaliação dos parâmetros de produção de fructooligossacarídeos pela biotransformação da sacarose pela linhagem osmofílica *Aureobasidium pullulans*.”

O efeito dos parâmetros de produção do processo de biotransformação de sacarose em fructooligossacarídeos pela linhagem osmofílica *Aureobasidium pullulans* foi avaliado pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), mais precisamente pelo planejamento de Plackett-Burman para 12 variáveis em seus respectivos níveis de estudo: concentração de sacarose (%) de 20 – 40; extrato de levedura (%) de 0 – 0,5; inóculo (%) de 1 – 20; K₂HPO₄ (%) de 0 – 0,0435; uréia (%) de 0 – 0,015; (NH₄)₂SO₄ (%) de 0 – 0,033; MgSO₄.7H₂O (%) de 0 – 0,0245; ZnSO₄ (%) de 0,0015; MnSO₄.7H₂O (%) 0 – 0,0010, pH de 4,5 a 6,0; temperatura (°C) de 27 – 30; agitação (RPM) de 150 – 250. Os maiores valores de rendimento obtidos foram de 54,7%, às 48 horas de incubação pelo tratamento 9, 49,97% às 24 horas pelo tratamento 4 e 49,34% as 24 horas pelo tratamento 12. O efeito das variáveis foi estimado para as respostas

concentração de frutooligossacarídeos totais e rendimento. Considerando as respostas de rendimento no tempo de 24 horas, a agitação, mostrou efeito negativo de -16,36 e p-valor de 0,016, $MnSO_4$ apresentou efeito positivo de 15,33 e p-valor de 0,020. Já as 48 horas a agitação foi o único parâmetro que apresentou efeito negativo de -14,94. A concentração de inóculo teve efeito positivo de 14,08 a 0 hora, porém as 24 e 48 horas o efeito foi negativo. Em relação à concentração de frutooligossacarídeos totais, a sacarose exibiu efeito positivo altamente significativo com p-valores de 0,085, 0,028 e 0,046 às 24, 48 e 72 horas respectivamente. O $MnSO_4$ foi o único mineral que exibiu efeito positivo para concentração de frutooligossacarídeos totais. Foi possível definir alguns parâmetros significativos, entretanto mais pesquisas devem ser realizadas para aperfeiçoar e otimizar o processo. Esta pesquisa, por sua vez pôde comprovar a efetiva aplicação do micro-organismo osmofílico *Aureobasidium pullulans* para síntese de frutooligossacarídeos por meio da bioconversão da sacarose utilizando células íntegras e obter o produto de maneira direta.

Palavras-chaves: frutooligossacarídeos, biotransformação, Plackett-Burman, micro-organismo osmofílico, prebiótico.

ABSTRACT

The effects of production parameters on the biotransformation of sucrose in fructooligosaccharides (FOS) by osmophilic microorganisms *Aureobasidium pullulans* was evaluated by the RSM (Response Surface Methodology) exactly Plackett-Burman Design with 12 variables: concentration of sucrose, inoculum, yeast extract, urea, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$. The strategy used was PB 16 with additional 3 central points, comprising 19 experiments. The levels of each variable (%) were sucrose: 20 – 40; yeast extract: 0 – 0.5; inoculum: 1 – 20; K_2HPO_4 : 0 – 0.0435; urea: 0 – 0.015; $(NH_4)_2SO_4$: 0 – 0.033; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0 – 0.0245; $ZnSO_4$: 0.0015; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0 – 0.001, pH: 4.5 a 6.0; temperature ($^{\circ}C$): 27 a 30; agitation (rpm): 150 a 250. The high yields reach values of 54.7% at 48h of reaction in treatment 9, 49.97% at 24h for treatment 4 and 49.34% in 24h for treatment 12. The variable effects were estimated for each parameter FOS Yield and total FOS concentration. The FOS Yield data showed significance at 24h the variables agitation, with negative effect -16.32 and p-value 0.016, $MnSO_4$, with positive effect 15.33 and p-value 0.020. At 48h the agitation was the only parameter significant with negative effect -14.94. The inoculum levels showed significance at 0h with positive effect 14.08, however it was negative at 24 and 48 hours. Regarding Total FOS Concentration, sucrose levels displayed p-values of 0.0085, 0.028 and 0.046 at 24, 48 and 72h respectively. $MnSO_4$ was the only mineral presenting stimulatory effect upon FOS concentration added. More research should be done to evaluate and optimize this process. This in turn can provide a focus for effective use of *Aureobasidium pullulans* to synthesize fructooligosaccharide through bioconversion using whole cells and obtaining the product by direct manner.

Keywords: fructooligosaccharides; biotransformation; Plackett-Burman design; osmophilic microorganisms; probiotic.

1. INTRODUCTION

The fructooligosaccharides (FOS) belonging to the prebiotics group that are “non-digestible oligosaccharides food ingredients but fermentable by the bacteria in the gut microbiota. They selectively promote growth of the beneficial bacteria (lactobacilli and bifidobacteria) and provide a series of benefits to the human health. Such effects include activation of the human immune system, maintenance the intestinal microbiota, resistance to infection, enhanced mineral absorption by the gastrointestinal tract, synthesis of B complex vitamin, lowering of serum cholesterol and preventing carcinogenic tumors [1]. Among the most important compounds found in functional foods are the oligosaccharides of the fructan type acting as bifidogenic agents and immune system stimulators associated with the intestinal mucosa [2].

Industrial production of this ingredient was mainly done using the enzyme fructosyltransferase of *Aspergillus niger* and *Aureobasidium sp.* reaching yield value around 60% and 53-59% respectively [3].

In our study, the synthesis of FOS was performed from sucrose metabolized by *Aureobasidium pullulans*, isolated from honeycomb. In this context this study was done through RSM (Response Surface Metodology) using a Plackett-Burman matrix with 16 assays (PB-16) to evaluate 12 variables: concentration of sucrose, inoculum, yeast extract, urea, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$. This method is a screening approach used to statistically select the significant variables of numerous factor-experiments, focusing on a reduction in the number of trials in the final design [4].

Therefore, the objective of this study was to evaluate the impact of several variables on sucrose biotransformtion into fructooligosaccharides.

2. MATERIALS & METHODS

The culture of *Aureobasidium pullulans* was maintained in YEPD slants, containing glucose 2% (w/v), yeast extract 1% (w/v), peptone 1% (w/v), agar 1.5 % (w/v) at 4°C. For the pre-inoculum cultivate a loopful of cells was streaked into YEPD plate, for 48h at 30°C. This was transferred to 150 mL culture medium of cane molasses containing 6% (w/v) of total reduce sugars for 48h, 150 rpm at 30°C. The suspension was centrifuged at $17,6 \cdot 10^3 \times g$ for 15 minutes and the cells were used for initial inoculum for the experiments that were done according strategy Plackett-Burman Experimental Design to identify the significant parameters in the fermentation process. According to the common parameters on the fermentation, N of the Plackett-Burman experimental design was set 16 to study 12 parameters effects, with the addition of 3 central points to estimate the experimental error. The parameters evaluated were the amount of sucrose, yeast extract, inoculum, K_2HPO_4 , urea, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ and the culture conditions as pH, temperature and agitation. The factor levels and codes were shown in Table 1.

Table 1. Codes and levels of factors of Plackett-Burman

Independent Variables		Levels		
		-1	0	+1
<i>X1</i>	Sucrose (%)	20	30	40
<i>X2</i>	Inoculum (%)	1	10.5	20
<i>X3</i>	pH	4.5	5.25	6.0
<i>X4</i>	Temperature (°C)	28	30	32
<i>X5</i>	Agitation (rpm)	150	200	250
<i>X6</i>	Yeast extract (%)	0	0.2500	0.5000
<i>X7</i>	Urea (%)	0	0.0075	0.0150
<i>X8</i>	K ₂ HPO ₄ (%)	0	0.0435	0.0435
<i>X9</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	0	0.0218	0.0330
<i>X10</i>	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	0	0.0165	0.0245
<i>X11</i>	ZnSO ₄ .7H ₂ O (%)	0	0.0008	0.0015
<i>X12</i>	MnSO ₄ .7H ₂ O (%)	0	0.0005	0.0010

Fermentations proceed in 125 mL flasks with 20 mL of medium and the sampling were done at 0, 24, 48 and 72 hours. The growth measuring was done by absorbance at 600 nm, and sugars by HPLC, column Lichrospher 100 NH₂, 26°C, 1 mL/min with acetonitrile:water 70:30 (v:v) as mobile phase.

3. RESULTS & DISCUSSION

The effects of the above 12 variables on yield, which were calculated through formula: $Y = [\text{total FOS}] * 100 / [\text{initial sucrose}]$ and concentration of total FOS % (g/100 mL) formed of the

response value were studied using Plackett-Burman experimental design, and the experimental design and the results were shown in

Table 2. The statistical analysis were conducted by the software STATISTICA® 7.0 considering a significant level of 10% ($p < 0.1$).

Table 2. Program and experiments results in Plackett-Burman

Treat-ment (T)	Variables or factors												0 hour		24 hour		48 hour		72 hour			
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	FOS (%)	Yield	FOS (%)	Yield	FOS (%)	Yield	FOS (%)	Yield		
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	6.58	16.45	7.71	18.03	8.49	18.35	3.60	7.32		
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	11.81	29.52	15.03	32.32	8.63	16.27	8.42	16.51		
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	0.00	0.00	20.52	49.97	10.22	21.78	11.2	23.94		
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	6.91	34.57	2.98	14.91	0.53	2.63	0.00	0.00		
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	0.00	0.00	7.05	14.45	3.55	8.86	3.63	6.65		
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	4.86	24.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	7.68	19.20	12.67	31.78	9.77	24.44	5.46	13.64		
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	4.00	10.00	9.57	22.60	22.30	54.70	4.22	9.05		
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	6.70	33.49	1.63	8.15	1.21	6.09	1.27	6.36		
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	1.35	6.76	3.87	19.33	2.82	14.09	0.72	3.61		
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1.42	3.55	20.34	49.34	16.96	38.16	14.5	30.46		
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	0,00	0,00	1,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	0,03	0,14	9,60	45,94	5,94	29,49	3,49	13,76		
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	0,15	0,74	7,05	35,26	3,13	15,64	3,70	18,51		
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,05	5,24	6,14	30,73	5,88	29,40	6,51	32,53		
PC1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,62	12,07	8,19	27,29	3,76	12,52	1,61	5,37		
PC2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,62	12,07	8,40	27,96	3,48	11,62	3,69	12,30		
PC3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,62	12,07	9,23	30,76	3,60	12,01	3,34	11,15		

A blank experiment without the inoculum, carried out the same conditions as the centre point, demonstrate that the amount of sucrose remained practically stable and none trace of fructoligosaccharide was formed.

The results showed that high yields reach values of 54.7% at 48h of reaction in T9, 49.97% at 24h in T4 and 49.34% in 24h in T12. The variable effects were estimated for each parameter FOS Yield and total FOS concentration.

For the FOS Yield data showed significance at 24h the variables agitation, with negative effect -16.32 and p-value 0.016; $MnSO_4$, with positive effect 15.33 and p-value 0.020. At 48h the variable was significant only agitation with negative effect -14.94. The inoculum level showed significance at 0h with positive effect 14.08, however it was negative at 24 and 48. Regarding Total FOS Concentration, sucrose levels displayed p-values of 0.0085 at 24h, 0.028 at 48h and 0.046 at 72h. $MnSO_4$ was the only mineral that presenting significant stimulatory effect upon FOS concentration added and urea was included considering alpha 0.2.

The statistical evaluation of the results is shown in Table 3.

Table 3. Estimates of the effects of the parameters analysed at 0, 24 and 48h of the fermentation process

Factor	YIELD (%)					[] Total FOS			
	Time (h)	Effect	SE	t (6)	P value	Effect	SE	t (6)	P value
<i>Mean</i>	0	11.59	2.17	5.35	<0.001	3.34	0.74	4.54	<0.001
	24	24.4	2.25	10.9	<0.001	7.95	0.90	8.80	<0.001
	48	16.6	3.10	5.36	<0.001	5.80	1.21	4.82	<0.001
<i>X1</i>	0	-3.32	2.36	-0.70	0.51	1.31	1.60	0.81	0.45
	24	7.40	4.90	1.51	0.18	7.58	1.97	3.85	0.01
	48	10.7	6.76	1.58	0.17	7.55	2.63	2.87	0.03
<i>X2</i>	0	14.1	2.36	2.98	0.02	3.65	1.60	2.28	0.06
	24	-9.48	4.90	-1.93	0.10	-1.04	1.97	-0.53	0.62
	48	-5.03	6.76	-0.74	0.48	0.42	2.63	0.16	0.88
<i>X3</i>	0	7.92	2.36	1.68	0.14	2.05	1.60	1.28	0.25
	24	6.99	4.90	1.43	0.20	2.69	1.97	1.37	0.22
	48	-4.08	6.76	-0.60	0.57	-1.76	2.63	-0.67	0.53
<i>X4</i>	0	-3.01	2.36	-0.64	0.55	-1.90	1.60	-1.18	0.28
	24	4.24	4.90	0.86	0.42	2.20	1.97	1.12	0.31
	48	3.98	6.76	0.59	0.58	2.45	2.63	0.93	0.39
<i>X5</i>	0	5.78	2.36	1.22	0.27	0.33	1.60	0.20	0.85
	24	-16.3	4.90	-3.33	0.02	-4.23	1.97	-2.15	0.08
	48	-14.9	6.76	-2.21	0.07	-4.42	2.63	-1.68	0.14
<i>X6</i>	0	-3.78	2.36	-0.80	0.45	-0.44	1.60	-0.28	0.79
	24	-7.94	4.90	-1.62	0.16	-2.78	1.97	-1.41	0.21
	48	2.50	6.76	0.37	0.72	0.79	2.63	0.30	0.77
<i>X7</i>	0	7.24	2.36	1.53	0.18	2.60	1.60	1.62	0.16
	24	9.12	4.90	1.86	0.11	3.33	1.97	1.69	0.14
	48	11.21	6.76	1.66	0.15	4.56	2.63	1.73	0.13
<i>X8</i>	0	-5.45	2.36	-1.15	0.29	-1.60	1.60	-1.00	0.36
	24	-4.20	4.90	-0.86	0.42	-1.57	1.97	-0.80	0.46
	48	-0.80	6.76	-0.12	0.91	-0.07	2.63	-0.03	0.98
<i>X9</i>	0	3.24	2.36	0.69	0.52	0.18	1.60	0.11	0.91
	24	-2.65	4.90	-0.54	0.61	-1.72	1.97	-0.87	0.42
	48	5.89	6.76	0.87	0.42	2.13	2.63	0.81	0.45
<i>X10</i>	0	-0.37	2.36	-0.08	0.94	0.44	1.60	0.27	0.80
	24	-1.76	4.90	-0.36	0.73	0.28	1.97	0.14	0.89
	48	-5.62	6.76	-0.83	0.44	-1.23	2.63	-0.47	0.66
<i>X11</i>	0	-6.92	2.36	-1.47	0.19	-1.70	1.60	-1.06	0.33
	24	3.25	4.90	0.66	0.53	1.95	1.97	0.99	0.36
	48	-5.04	6.76	-0.75	0.48	-1.29	2.63	-0.49	0.64
<i>X12</i>	0	-4.33	2.36	-0.92	0.39	-0.88	1.60	-0.55	0.60
	24	15.33	4.90	3.13	0.02	4.82	1.97	2.45	0.05
	48	2.64	6.76	0.39	0.71	1.33	2.63	0.51	0.63

Note: SE Standard error. Parameters in bold are statistically significant for the response

($P < 0.1$), considering the residual SS.

For further optimization studies will be considered the factors sucrose, inoculum, urea, MnSO_4 concentrations and agitation.

Inoculum Effect - the concretion of inoculums present positive effect only at 0h, that in this time, the action of the enzyme is immediately and major concentration of product is formed. In other times, this showed negative effect, because the synthesis of FOS seems to be related with the growth of *Aureobasidium* and production of the enzyme. However is necessary to study this carefully. The figure 1 presents the values of yield and growth for comparison.

Sucrose Effect – the sucrose certainly is related positively with synthesis of FOS once the activity of the fructosiltransferase and transfructosilation performe with more efficiency in medium with high concentration of the substrate.

Agitation effect - in this case, showed a negative effect, probably this is explained by the damage caused to the cells when it is accelerate.

Metal ions: In general, metal ions can impact on yeast growth and metabolic processes during fermentation by influencing several important parameters including yeast growth, viability, enzyme activities, stress tolerance, etc. Therefore it is necessary to screen vital mineral nutrients for production of industrially important enzymes. Considering this, the others minerals will not be exclude once they can be essential for the process and will be fix the concentration in the central point.

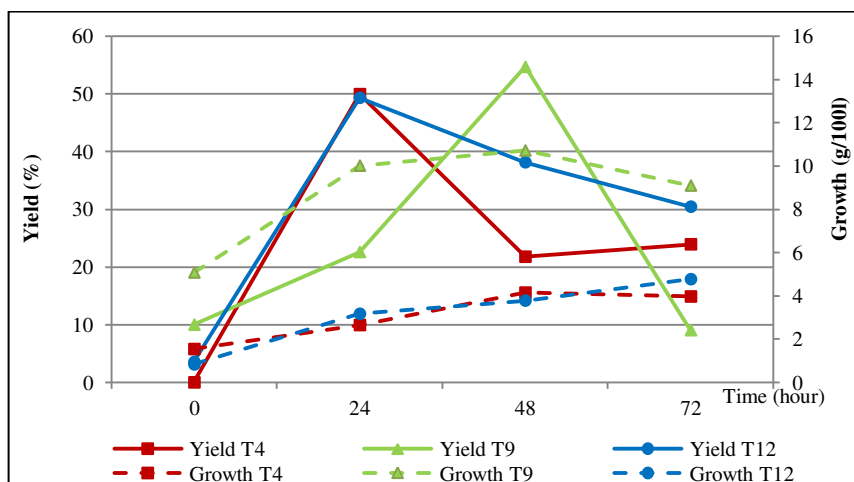


Figure 1. Experimental values obtained in samples at 0,24, 48 and 72 hours and simulated time temperature profile.

On this study, the highest conversion yield obtained was 54.7% and 223 g/L of FOS total with 400 g/L of initial sucrose concentration. This expresses the productivity of 4.6 g/L.h and considering T4, the productivity reaches a value of 8.55 g/L.h.

These results are showing that this process is very promising for the FOS industry considering that the conditions still have not been optimized and comparing it with commercial scale of 200 a 300 g/L neoFOS production and with another studies how synthesis of Neo-FOS by *Xantophillomyces dendrorhous* cells that reached 222.72 g/L from 400 g/L of initial sucrose [5].

The process showed similar results also with biotransformation of sucrose in FOS by *Penicillium expansum* that was directly inoculated in sucrose medium (110 g/L) and presented yield ($Y_{P/S}$) of 0,58 g FOS/g initial sucrose and productivity 3.25 g/L.h [6].

Therefore, this process was considered to be an added advantage for commercial applications and could be scaled up for commercial production.

4. CONCLUSION

More research has been done to evaluate and optimize this process. This in turn can provide a focus for effective use of *Aureobasidium pullulans* to synthesize fructooligosaccharide through bioconversion using entire cells to obtain the product by direct manner.

REFERENCES

- [1] Gibson, G.R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulations of the human colonic microbiota – Introduction and concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- [2] Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M.S.C., Pastore, G.M. 2010. Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43, 1231–1236.
- [3] Yun, J.W. 1996. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbiol Technology*, 19, 107-117.
- [4] Rodrigues MI, Iemma AF (2005) Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, Campinas, Brazil
- [5] Ning, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, N., Jin, Z., Xu, X. 2010. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 101, 7472–7478.
- [6] Prata, M.B., Mussatto, S.I., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. 2010. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*, 32, 837-840.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MELAÇO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE EM FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

Artigo a ser submetido ao periódico Ciência e Tecnologia de Alimentos

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MELAÇO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE EM FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR AUREOBASIDIUM PULLULANS

RESUMO

O efeito do melaço de usina de açúcar sobre a produção de frutooligossacarídeos pela biotransformação da sacarose pela linhagem de *Aurebasidium pullulans* foi realizada por meio de ensaios delineados, utilizando meios contendo 40% de sacarose inicial e suplementados ou não com os nutrientes: extrato de levedura, uréia, bifosfato de potássio, sulfato de amônia, de magnésio, de zinco e de manganês. Os ensaios diferenciaram também, quanto ao inóculo microbiano, o qual foi avaliado na forma de biomassa úmida e suspensão celular. O processo conduzido com inóculo como suspensão celular e meio sem adição de suplementos diferiu estatisticamente dos outros tratamentos, atingindo uma produção de FOS totais de 288 g/L e uma produtividade de 10,3 g/L.h, indicando que o melaço torna desnecessário a suplementação do meio com sais e outros nutrientes, para este processo.

1. INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos prebióticos denominados açúcares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro e promovem seletivamente o crescimento de como lactobacilos e bifidobactérias presentes no cólon intestinal. (GIBSON & ROBERFROID, 1995). São

atualmente muito utilizados em produtos alimentares e seu consumo tem aumentado muito nos últimos anos (WHANG *et al.*, 2009).

Devido à atual demanda por alimentos funcionais, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de aperfeiçoar e diminuir custos do processo de síntese de FOS utilizando metodologias alternativas às atualmente utilizadas (TRIVEDI, DIVESHA & SHAH, 2012).

Como uma alternativa para a diminuição de custos de processos biotecnológicos, os resíduos da agroindústria apresentam um alto potencial para serem utilizados como meios de cultivo para o crescimento de micro-organismos devido à sua elevada quantidade de nutrientes em sua composição e seu baixo custo. Dentre eles estão o soro do leite, a manupueira, água de maceração de milho e xarope de milho e o melão de usina de açúcar (BICAS *et al.*, 2010).

Particularmente este último possui altos teores de açúcares, em torno de 50%, e uma variedade de sais em sua composição, provenientes da cana-de açúcar, como o cálcio, fósforo, potássio, magnésio, e vitaminas (AMORIM *et al.*, 2009) tornando-o atrativo para a utilização como meio de cultivo microbiano.

Sendo assim, o melão tem sido aproveitado para a obtenção de biomassa microbiana e síntese de enzimas (DORTA *et al.*, 2006) e também para o aproveitamento de conversão de sacarose em FOS, uma vez que este apresenta altas concentrações do açúcar (SHIN *et al.*, 2004).

A verificação da ausência de efeito dos sais suplementados no meio reacional da biotransformação da sacarose em FOS, conforme apresentado no capítulo 3, indicou que o meio p a base de melão de usina-de-açúcar, para o cultivo do inóculo, poderia estar carreando para o meio reacional, muitos micronutrientes essenciais ao micro-organismo em quantidades suficientes, mascarando a influência dos micronutrientes presentes na composição do meio formulado.

Sendo assim foram realizados experimentos estratégicos sequenciais, a fim de se obter uma padronização do inóculo e verificar o efeito do melão como substrato para obtenção do inóculo e no processo de síntese de FOS pela biotransformação da sacarose pelo *Aureobasidium pullulans*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo

A cultura do *Aureobasidium pullulans* foi mantida em tubos inclinados contendo o meio de cultura YEPD, cuja formulação é glucose 2% (m/v), extrato de levedura 1% (m/v), peptona 1% (m/v), ágar 1.5 % (m/v) por 4°C. Periodicamente a cultura era reativada em tubo líquido e armazenada em novo tubo inclinado com meio YEPD.

Para ativação das células e cultivo do inóculo, as células foram reativadas em 3 mL de YEPD por 24h a 30°C e, após este período, uma alçada foi estriada em placa de petri contendo YEPD ágar e incubada por 48h a 30°C.

Para o cultivo do inóculo, uma alçada da cultura crescida em placa foi inoculada em 150 mL de meio de cultura a base de melão de usina e água diluído contendo 6% (p/v) de açúcares redutores totais (ART), e incubada por 48h, 150 rpm a 30°C. A concentração de ART no melão utilizado neste estudo era de 52,34% de ART.

Para avaliar o efeito da utilização do melão como meio de cultivo do inóculo e verificar o efeito da composição de nutrientes desse meio no processo de biotransformação, foram utilizados como inóculo duas culturas distintas: inóculo na forma de suspensão celular (IS) e inóculo na forma de

biomassa celular úmida (IB). Outra distinção foi realizada no meio reacional, o qual poderia conter ou não conter a suplementação de sais, conforme os diferentes ensaios apresentados na Tabela 1.

O inóculo como biomassa (IB) foi obtido através da centrifugação da suspensão celular a 17.000 x g por 15 minutos e a biomassa úmida centrifugada foi utilizada nos ensaios na concentração de 10% (p/v). Para o inóculo em suspensão, apenas foi utilizada a cultura crescida, obtida após o cultivo em meio de melão e, a suspensão celular foi utilizada nos ensaios na concentração de 10% (v/v).

2.2. Biotransformação da sacarose em frutooligosacarídeos (FOS)

A biotransformação da sacarose em FOS foi realizada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de meio contendo 40% de sacarose. O pH foi ajustado a 6,0 e a cultivo foi realizado sob agitação de 150 rpm e temperatura a 30°C por um período de 72h com amostragens realizadas a cada 24 horas de processo.

Tabela 1: Planejamento do experimento da avaliação do inoculo.

<i>Tubo</i>	<i>Tratamento</i>
<i>1</i>	IBS
<i>2</i>	biomassa
<i>3</i>	com suplementos
<i>4</i>	ISS
<i>5</i>	suspensão com
<i>6</i>	suplementos
<i>7</i>	IB
<i>8</i>	biomassa
<i>9</i>	sem suplementos
<i>10</i>	IS
<i>11</i>	suspensão
<i>12</i>	sem suplementos

Nota: IBS: inóculo biomassa com suplementação; ISS: inóculo suspensão celular com suplementação; IB: inóculo biomassa sem suplementação; IS: inóculo biomassa sem suplementação.

A suplementação de sais foi realizada nos tratamentos IBS e ISS nas concentrações, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração dos suplementos utilizados no meio de biotransformação da sacarose

<i>Suplementos</i>	<i>Concentração (%)</i>
<i>Extrato de lev.</i>	0,15
<i>Ureia</i>	0,02
<i>K₂HPO₄</i>	0,01
<i>(NH₄)₂.SO₄</i>	0,01
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	0,005
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	0,001
<i>MnSO₄.7H₂O</i>	0,002

2.3. Análises dos carboidratos

As amostras coletadas foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à inativação enzimática através de banho-maria em ebulição por 10 minutos. As amostras foram diluídas 10.000 vezes em água deionizada e filtradas em filtros de membrana com porosidade 0,22 µm para a análise.

As análises dos carboidratos foram realizadas pelo sistema de cromatografia de íons acoplada ao detector amperiométrico pulsado (HPAEC-PAD), com a coluna Carbopac PA-100, a 30 °C e fluxo de 1 mL/minuto, utilizando a bomba Single Grad Degas e o software de Automação Cromatográfica Chromeleon 7.0 CHM-1, da Dionex (USA).

Para a eluição dos açúcares, foi realizado um gradiente entre duas soluções: solução A (100 mM de hidróxido de sódio) e solução B (100 mM de hidróxido de sódio e 500 mM de acetato de sódio). De 0 a 17,5 minutos foi realizado um gradiente linear de 0 a 30% de B em A, para eluição dos açúcares e, após isso, foi realizada a limpeza da coluna com 6 minutos de eluição 100% da solução B e estabilização por mais 6 minutos com 100% da solução A. Foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose da marca Sigma e os padrões de frutooligosacarídeos: kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil-nistose (GF₄) da Wako Pure Chemicals.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração dos FOS totais produzidos em cada tratamento IBS, ISS, IB e IS está apresentado na Tabela 3. O rendimento do processo foi calculado a partir da concentração de sacarose inicial através da fórmula: $Y = \frac{[\text{total FOS}] * 100}{[\text{sacarose inicial}]}$. As médias foram submetidas à análise estatística pelo programa STATISTICA[®] 7.0, considerando o nível de significância de 10% ($P < 0,1$), para a análise de médias pelo teste de Tukey.

Tabela 3: Concentração de Frutooligossacarídeos Totais (%)

	<i>TRAT.</i>	<i>0 h</i>	<i>28 h</i>	<i>52 h</i>	<i>72 h</i>
1	IBS	8,86	13,7	8,99	6,73
2		7,04	14,7	10,5	6,68
3		6,56	13,7	8,5	6,91
Média		7,49	14,0	9,32	6,77
4	ISS	0	22,7	17,8	13,9
5		0	23,8	18,2	14,1
6		0	21,6	17,3	14,3
Média		0	22,7	17,8	14,1
7	IB	8,76	14,1	8,77	7,05
8		7,98	14,8	9,89	7,95
9		6,9	13,3	9,03	6,89
Média		7,88	14,1	9,23	7,3
10	IS	0	28,9	24,2	24,3
11		0	29,3	24,8	25,34
12		0	28,1	26,4	25,18
Média		0	28,8	25,2	24,94

Dentre os diferentes tratamentos realizados, o tratamento IS, que utilizou o inóculo na forma de suspensão celular e o meio de síntese de sacarose sem suplementação de sais apresentou o melhor resultado, diferindo estatisticamente ao nível de 10% de significância.

Para este tratamento, os resultados de concentração de frutooligossacarídeos totais obtidos durante o processo foram de 28,8% (m/v) em 28 horas de processo, significando uma produção de 288 g/L de FOS totais e uma produtividade de 10,3 g/L.h.

A Figura 1 ilustra os resultados obtidos para cada um dos tratamentos com relação ao teor de FOS produzidos e rendimentos atingidos.

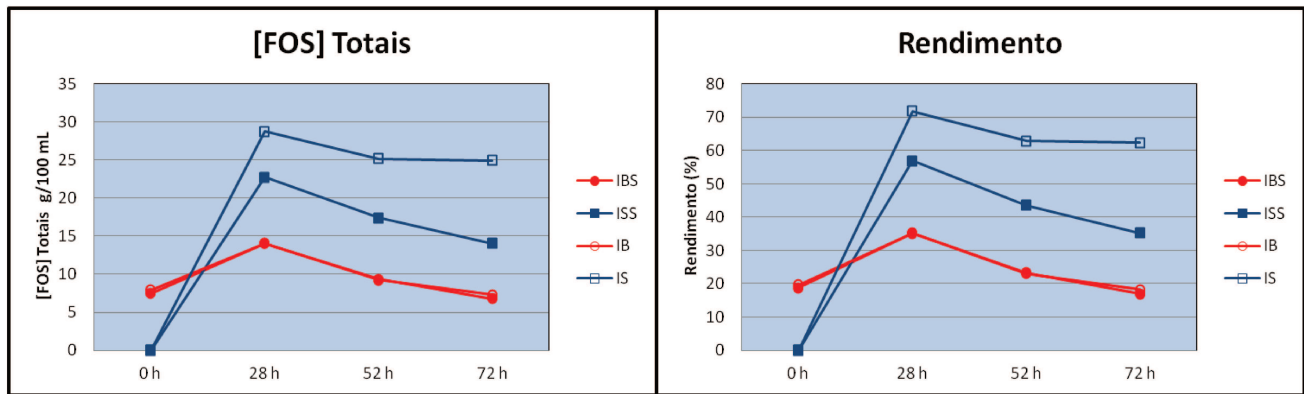


Figura 1: Concentração de FOS totais e rendimento obtido durante o processo.

Ao analisar estatisticamente a média de cada tratamento realizado durante todo o processo, foi possível confirmar a diferença estatística do tratamento IS, com relação aos dos outros tratamentos. A Figura 2 representa a diferença estatística entre os tratamentos em todo o período de processo.

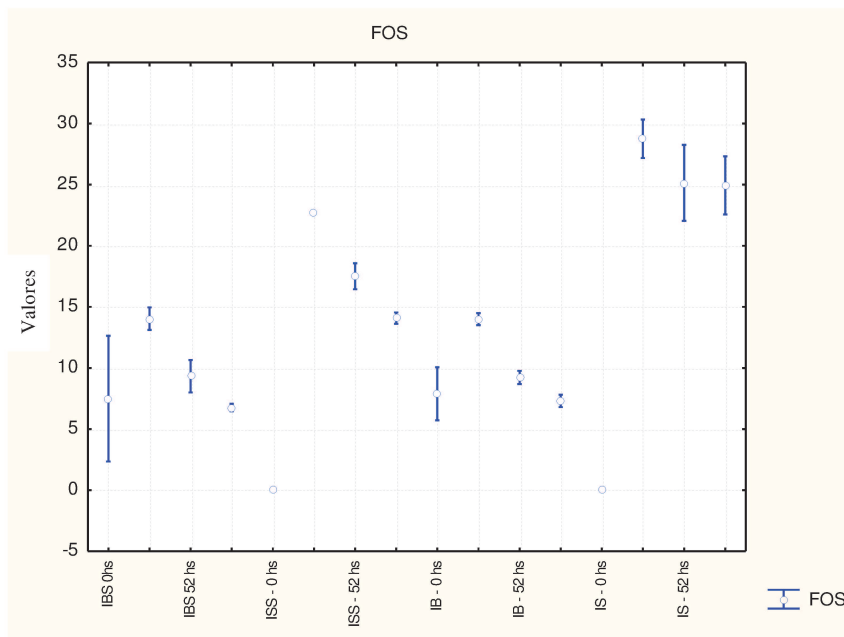


Figura 2: Análise de médias obtidos através dos resultados do Tukey, pelo programa STATISTICA[®]7.0.

De acordo com os resultados, pôde-se concluir que o uso da suplementação de sais não se faz necessária e a utilização do inóculo na forma de suspensão celular em meio de melão se mostrou ser a melhor alternativa para o processo. A utilização do inóculo na forma de biomassa com e sem suplementação (IBS e IB respectivamente), se mostraram idênticas quanto à síntese de FOS, não diferindo estatisticamente entre si, comprovando mais uma que a suplementação de sais não é necessária quando se utiliza o melão como meio de cultivo.

Este fato possivelmente se deveu pela alta concentração de sais no melão, os quais, possivelmente foram carregados juntamente com o inóculo para o meio reacional, contendo a sacarose para a conversão em FOS.

Os sais minerais no meio de produção de FOS utilizando células, têm sido relatados como estimulantes para a produção pelos micro-organismos (SANGEETHA, RAMESH & PRAPULLA, 2005). Este efeito foi evidenciado por Vigants *et al.* (2000) que notou um incremento de 6,5 vezes na produção de FOS, em meio contendo 65% de sacarose com sais minerais, pela bactéria *Zimomona mobilis*. (2000).

Dorta *et al.*, (2006) também confirmou a eficiência do melão como meio de cultivo alternativo para crescimento e produção de enzima frutossiltransferase para a síntese de FOS por *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus niger*, além de ser uma fonte abundante e de baixo custo.

4. CONCLUSÕES

A utilização do melão na etapa do cultivo do inóculo mostrou ser eficiente para o processo, tornando desnecessária a suplementação de sais na etapa da bioconversão da sacarose pelo micro-

organismo. O processo conduzido com inóculo como suspensão celular e meio sem adição de suplementos atingiu uma produção de FOS totais de 288 g/L e uma produtividade de 10,3 g/L.h, mostrando-se superior aos tratamentos utilizando biomassa úmida como inóculo e suplementado com sais minerais e outros nutrientes. A partir desses resultados, muitos parâmetros do processo puderam ser excluídos, facilitando posteriores estudos de aperfeiçoamento e otimização da síntese de FOS pela biotransformação da sacarose utilizando a linhagem *Aureobasidium pullulans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: Composition and usage. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; ASTIN, G.D.; KLUHSPIES, C (Editors). **The alcohol textbook**. 6 ed. Nottingham, U.K.: Nottingham University Press, 2009. Cap.5, p. 39-46.

BICAS, J.; SILVA, J.C.; DIONÍSIO, A.P. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p.7-18, 2010.

DORTA, C. *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiol Biotechnol**, v. 33, p.1003–1009, 2006.

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.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends In Food & Technology**, v. 16, p.442-457, 2005.

SHIN, H.T. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, n. , p.52-62, 2004.

TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p.483-490, 2012.

VIGANTS, M. B. A., *et al.* The effect of osmo-induced stress on product *foramtion* by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.147–150, 2000.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, Germany, v. 42, p.8-12, 2009.

CAPÍTULO 5

OTIMIZAÇÃO

**DA SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA
BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE POR *AUREOBASIDIUM
PULLULANS* PELA TÉCNICA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

Artigo a ser submetido no periódico Food Chemistry

CAPÍTULO 5

OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA BIOTRANSFORMAÇÃO DA SACAROSE POR AUREOBASIDIUM PULLULANS PELA TÉCNICA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

RESUMO

A otimização da produção de frutooligossacarídeos foi realizada utilizando o processo de biotransformação da sacarose pelo micro-organismo osmofílico *Aureobasidium pullulans* a partir de planejamento experimentais sequenciais. Primeiramente foi realizado um planejamento fatorial fracionado para 4 variáveis e em seguida um delineamento composto central rotacional para duas variáveis. Foi possível definir quatro modelos preditivos para o processo, e as condições otimizadas foram definidas em 600 a 650 g/L de sacarose e em 20 a 23% de inóculo. Nessas condições foi possível atingir valores de máxima produção de GF₂ em 205 g/L as 24 horas, GF₃ em 187 g/L as 48 horas e GF₄ em 72 g/L às 72 horas, alcançando uma produtividade em frutooligossacarídeos totais de 14,7 g/L.h às 24 horas de processo.

1. INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) constituem uma importante classe de carboidratos que vêm recebendo uma especial atenção. São oligossacarídeos não convencionais, não digeríveis, porém fermentáveis seletivamente pelas bifidobactérias e lactobacilos presentes no cólon intestinal.

Este processo promove uma série de benefícios à saúde como estímulo e melhora do sistema imunológico, maior absorção intestinal de minerais, diminuição do colesterol sérico, maior síntese de vitaminas do complexo B, prevenção de doenças crônicas, entre outras (MANNING, T. S. & GIBSON, 2004), enquanto suprimem o crescimento de bactérias patogênicas (ROBERFROID, 2002).

A produção desses compostos industrialmente é realizada utilizando-se enzimas microbianas com atividade de transfrutossilatação, principalmente pelos micro-organismos como o *Aspergillus niger* e o *Aureobasidium pullulans* (YUN, 1996; SANGUEETTA *et al.*, 2005). Também podem ser sintetizados a partir da extração e hidrólise da inulina de fontes vegetais, entretanto, a produção via biotecnológica utilizando micro-organismos e enzimas microbianas apresentam inúmeras vantagens com relação a extração de fontes vegetais (ALMÉCIGA-DIAZ *et al.*, 2011; YUN 1996).

O *Aureobasidium* é um dos micro-organismos que mais se destacam na capacidade de síntese de FOS e possuem maiores quantidades de relatos científicos nessa área (YUN, 1996; YOSHIKAWA, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2012). A síntese de FOS é realizada, principalmente, através da catálise enzimática, na qual primeiramente o fungo é cultivado para a produção da enzima frutossiltransferase, e após isso, a enzima é adicionada em substrato contendo altas concentrações de sacarose para que a reação enzimática ocorra e os FOS sejam produzidos (MADOVÁ *et al.*, 2008). É considerado um fungo em fase transitória com levedura e se caracteriza por sua capacidade osmofílica, sendo hábil em crescer em ambientes contendo alta pressão osmótica e altas concentrações de açúcares no meio (ONISH, 1963).

Apesar da produção de FOS e da enzima frutossiltransferase estarem sendo continuamente melhorados (MUSSATO *et al.*, 2010; MUSSATO *et al.*, 2013), pouco são os estudos publicados na

literatura que utilizam processo de biotransformação da sacarose por células íntegras de micro-organismos.

A biotransformação difere dos outros processos já estabelecidos e aplicados industrialmente, por se tratar da utilização de células microbianas íntegras e viáveis, como biocatalizador, denominadas “whole cell biotransformation”, ao invés da produção e purificação da enzima e reação catalítica (BUCHHOLZ *et al.*, 2008).

Recentemente, algumas pesquisas estão sendo realizadas como o intuito de melhorar o desempenho da biotransformação da sacarose em FOS (DOMINGUES *et al.*, 2012; NING *et al.*, 2012). Os experimentos de planejamento fatorial são ferramentas úteis para otimizar processos por permitir avaliar uma variedade de fatores simultaneamente em diferentes combinações (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

O presente trabalho tem como objetivo otimizar o processo de biotransformação da sacarose em FOS utilizando o micro-organismo osmofílico *Aureobasidium pullulans*, tendo em vista sua osmofilicidade, por meio das técnicas de planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta.

Em nossos estudos anteriores (Capítulo 4) foram realizados testes para a padronização do inóculo através do crescimento do micro-organismo em melaço de usina de açúcar e a suspensão celular foi definida como inóculo. Sendo assim, foram consideradas neste estudo as variáveis: concentração do melaço, tempo de cultivo do pré-inóculo, concentração do inóculo e sacarose no meio de síntese de FOS. Foram realizados experimentos sequenciais, primeiramente um planejamento fatorial fracionado para 4 variáveis e em seguida um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo

O *Aureobasidium pullulans*, micro-organismo utilizado neste estudo foi previamente isolado de favo-de-mel e identificado pelo sequenciamento do DNA ribossômico 18S, cuja a sequência foi disponibilizada no banco de dados GenBank com o número de acesso GQ246207, em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa.

A linhagem foi mantida em tubos inclinados contendo meio YEPD ágar contendo 2% de glicose, 1% extrato de levedura, 1% de peptona, 1,5% de ágar e ativada em 3 mL de meio YEPD caldo a 30°C por 24h. Após o crescimento, a cultura foi estriada em placa petri contendo YEPD ágar e incubada por 48h a 30°C.

Uma alçada da cultura em meio sólido foi transferida para o meio de cultivo do inóculo composto de melaço de usina de açúcar e água. O melaço utilizado nos experimentos foi previamente analisado quanto aos teores de açúcares redutores totais (ART) e continha 52,34%, dentre eles baixa concentração de glicose e frutose e alta concentração de sacarose. O inóculo foi cultivado em frascos erlenmeyers contendo 100 mL de meio e incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. A concentração ART no meio e tempo de cultivo variaram de acordo com as estratégias experimentais adotadas e descritas a seguir.

2.2. Estratégia sequencial de planejamentos experimentais para biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos

A biotransformação da sacarose em FOS foi conduzida em Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de meio e incubação sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C por um período de 72 a 96 horas com amostragens realizadas a cada 24 horas. As concentrações de sacarose e inóculo variaram de acordo com as estratégias experimentais de delineamento fatorial fracionado e do delineamento composto centra rotacional (DCCR). Os planejamentos experimentais sequenciais foram realizados de acordo com a metodologia de planejamentos de experimentos de Rodrigues e Iemma (2009).

2.2.1. Delineamento experimental fatorial fracionado

Foram consideradas para este experimento quatro variáveis para avaliar o efeito sobre o processo: a concentração de ART no melão e o tempo de incubação do inóculo, ambos na etapa do cultivo do inóculo, e concentração do inóculo (v/v) e concentração de sacarose no meio para biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos. Os níveis avaliados para cada variável estão apresentados na Tabela 1 e, na Tabela 3, estão apresentados a matriz do delineamento juntamente com os resultados experimentais obtidos.

Tabela 1: Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial fracionado para o estudo dos efeitos sobre o processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

<i>Variáveis</i>		<i>Níveis</i>		
		-1	0	1
<i>X1(M)</i>	[ART] % no melaço	2,5	6,25	10
<i>X2(t)</i>	Tempo cultivo inóculo (h)	48	60	72
<i>X3(S)</i>	[Sacarose] (g/L)	350	450	550
<i>X4(I)</i>	[Inóculo] (% v/v)	5	10	15

2.2.2. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Em sequência ao planejamento fatorial fracionado, foram definidas duas variáveis que apresentaram efeitos significativos no delineamento, as quais foram investigadas quanto às suas faixas de concentração a fim de atingir o ponto ótimo de máxima produção de frutooligosacarídeos para este processo. Sendo assim, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes com duas repetições no ponto central e dois pontos axiais.

As definições das variáveis e seus parâmetros foram estipuladas de acordo com os resultados preliminares obtidos pelo planejamento fatorial fracionado apresentados neste capítulo. Sendo assim, foram consideradas as variáveis concentração de sacarose e de inóculo na etapa de biotransformação.

Para o preparo do inóculo foi padronizado a concentração do melaço em 10% de ART e tempo de cultivo em 48 horas, para obtenção da suspensão celular com 1.10^8 cél/mL, confirmada através da análise de densidade óptica descrita item 2.4 deste capítulo. Após isso, a suspensão celular foi inoculada no meio contendo sacarose em diferentes concentrações de acordo com a descrição dos fatores e dos níveis estudados neste planejamento de DCCR, apresentados nas Tabelas 2 e na Tabela 7, a qual contém a matriz do delineamento juntamente com os resultados experimentais.

Tabela 2: Variáveis e níveis avaliados no Planejamento DCCR para o estudo da otimização e validação do processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

	<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
		-1,41	-1	0	1	1,41
<i>X1 (S)</i>	<i>Sacarose (g/L)</i>	400	444	550	656	700
<i>X2 (I)</i>	<i>Inóculo (% v/v)</i>	15	16,5	20	23,5	25

2.3. Análise dos frutooligossacarídeos produzidos

As amostras coletadas durante o processo foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à inativação enzimática através de banho-maria em ebulição por 10 minutos. As amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em filtros com porosidade 0,22 µm para a análise.

As análises dos FOS produzidos foram realizadas pelo sistema de cromatografia de íons acoplada ao detector amperiométrico pulsado (HPAEC-PAD), com a coluna Carbowac PA-100 a 30°C, volume de injeção de 25 µL, fluxo de 1 mL/minuto, utilizando a bomba Single Grad Degas e o software de Automação Cromatográfica Chromeleon 7.0 CHM-1, todos da marca Dionex (USA).

Para a eluição dos açúcares, foi realizado um gradiente entre duas soluções: solução A (100 mM de hidróxido de sódio) e solução B (100 mM de hidróxido de sódio e 500 mM de acetato de sódio). Primeiramente, foi realizado um gradiente linear de 0 a 30% de B em A por 17,5 minutos, e em seguida foi realizada a etapa de limpeza e estabilização da coluna. Foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose da marca Sigma e de frutooligossacarídeos kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil-nistose (GF₄) da Wako Pure Chemicals.

2.4. Avaliação da concentração celular e crescimento do micro-organismo

O crescimento do micro-organismo foi acompanhado a cada 24 horas de amostragem durante o processo. Para o crescimento foram realizadas leituras de densidade óptica a $\lambda = 600$ nm, e a concentração de celular foi calculada através da construção prévia curva de calibração entre os fatores densidade óptica x biomassa seca (g/L) para a linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

A concentração celular (cél/mL) foi analisada através de leituras de densidade óptica a $\lambda = 600$ nm e convertida em concentração celular por meio da curva de calibração previamente construída entre densidade óptica x concentração celular (cél/mL).

A contagem das células foi realizada por microrcopia óptica em câmara de Neubauer e calculada pela seguinte fórmula, conforme metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1996).

$$\text{População (cél/mL)} = \frac{\text{Total de células}}{\text{Total de retículos contados}} \times 4000 \times 1000 \times \text{diluição}$$

2.5. Avaliação da atividade enzimática durante o processo

A atividade enzimática foi acompanhada a cada 24 horas de amostragem durante o processo.

Para mensurar a atividade enzimática total, a qual representa tanto a atividade da enzima intracelular como extracelular, uma alíquota de 0,2 mL de amostra da suspensão celular (contendo células e meio com enzima extracelular liberado durante o processo de biotransformação da sacarose) foi adicionada em 0,8 mL de substrato enzimático contendo 50% de solução de sacarose em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A reação foi realizada a 55°C por 30 minutos e paralisada em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida pela quantidade

de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por minuto. A glicose foi determinada a partir do reagente colorimétrico glicose oxidase (GOD/PAD) da Kovalent.

2.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA), considerando como resposta a concentração de FOS totais (T FOS), de GF₂, GF₃ e GF₄. Os valores de rendimentos estão apresentados nas tabelas de resultados, contudo não foram considerados nas análises estatísticas por não representarem as maiores concentrações do produto, uma vez que estes são dependentes do teor de sacarose inicial e altos rendimentos também são atingidos em baixos teores de sacarose inicial no meio, não representando maior concentração do produto.

O nível de significância utilizado para os planejamentos fatorial fracionado e DCCR foram de 10% ($p\text{-valor} < 0,1$). Este valor foi definido por considerar a variabilidade experimental intrínseca aos processos biológicos que envolvem micro-organismos e enzimas (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi realizado primeiramente o planejamento fatorial fracionado, com o intuito de verificar, dentre os fatores intrínsecos a esse processo, os mais relevantes e que apresentam efeitos estatisticamente significativos, a fim de diminuir o número de fatores estudados para o posterior experimento de DCCR. Sendo assim, primeiramente serão apresentados os resultados deste planejamento e, em seguida, os do DCCR.

3.1 Planejamento fatorial fracionado

Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados na Tabela 3 e as análises dos efeitos estatísticos para cada uma das respostas frutooligossacarídeos totais (T FOS) (g/L), GF₂ (g/L), GF₃ (g/L) e GF₄ (g/L), nos tempos de 24, 48 e 72 horas de processo estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 3: Matriz do delineamento fatorial fracionado e respostas experimentais do estudo dos efeitos das concentrações do melão e tempo de cultivo do inóculo, e concentrações de sacarose e do inóculo sobre o processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

TRAT.	Variáveis				GF ₂ (g/L)			GF ₃ (g/L)			GF ₄ (g/L)			T FOS (g/L)			Rendimento		
	X1(M)	X2 (t)	X3(S)	X4(I)	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1	-1 (2,5)	-1(48)	-1(350)	-1(5)	223	161	120	39,9	98,4	123,9	0,0	16,0	36,8	263	275	281	71,6	75,1	76,5
2	1(10)	-1(48)	-1(350)	1(15)	153	65,2	76,1	90,4	97,1	98,7	15,3	79,3	46,3	258	242	221	71,2	66,6	60,9
3	-1 (2,5)	1(72)	-1(350)	1(15)	200	193	155	38,3	86,3	120	2,05	10,9	26,8	240	290	302	66,2	80	83,2
4	1(10)	1(72)	-1(350)	-1(5)	121	91,9	61,9	69,4	115	91,1	11,5	49,8	72,7	202	257	226	55,1	70	61,5
5	-1 (2,5)	-1(48)	1(550)	1(15)	233	202	202	55,4	17,6	79,4	4,5	0,0	9,9	293	220	291	53,2	39,9	53
6	1(10)	-1(48)	1(550)	-1(5)	186	241	203	16,9	64,8	96,3	0,0	0,0	15,0	203	305	314	36,9	55,5	57,2
7	-1 (2,5)	1(72)	1(550)	-1(5)	178	267	245	10,7	39,7	67,2	0,0	0,0	0,0	188	306	312	34,2	55,7	56,7
8	1(10)	1(72)	1(550)	1(15)	237	171	123	85,5	141	149	10,4	41,9	82,8	333	354	355	60,6	64,4	64,5
9	0 (6,5)	0(60)	0(450)	0(10)	207	135	122	66,1	127	103	7,2	41,4	28,3	281	303	253	59,8	64,7	53,9
10	0 (6,5)	0(60)	0(450)	0(10)	195	130	77,6	59,6	119	101	6,42	38,0	75,1	261	287	253	55,7	61,3	54
11	0 (6,5)	0(60)	0(450)	0(10)	223	129	84,6	67,0	119	112	6,61	39,1	82,1	296	287	279	63,2	61,2	59,4
12	0 (6,5)	0(60)	0(450)	0(10)	217	123	75,3	66,4	112	98,8	6,64	36,9	72,3	290	272	246	61,8	58,1	52,5
Média	0 (6,5)	0(60)	0(450)	0(10)	198	159	129	55,5	94,7	103	5,88	29,4	45,7	259	283	278	57,5	62,7	61,1

Nota: [T FOS]: Concentração de Frutooligossacarídeos totais (GF₂+GF₃+GF₄) em g/L; Rendimento: ([Total FOS]/[Sac_{ini}])*100.

Tabela 4: Estimativas dos efeitos dos parâmetros analisados concentração do melão e tempo de cultivo do inóculo, e concentrações de sacarose e do inóculo, sobre as respostas [T FOS] no processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

	[T FOS] g/L						Rendimento					
	24h		48h		72h		24h		48h		72h	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
<i>Média</i>	259	0,00	283,3	0,00	267	0,00	57,3	0,00	62,7	0,00	0,588	0,00
<i>X1(M)</i>	3,18	0,91	16,5	0,49	-17,5	0,72	-4,2	0,44	4,10	0,12	0,023	0,69
<i>X2(t)</i>	-13,3	0,66	41,4	0,11	21,5	0,66	-19,4	0,01	-9,50	0,00	-0,064	0,28
<i>X3(S)</i>	13,3	0,66	30,3	0,22	60,7	0,23	-0,40	0,94	0,70	0,76	-0,032	0,58
<i>X4(I)</i>	67,05	0,05	-9,70	0,68	9,10	0,85	13,0	0,04	-0,70	0,78	0,012	0,83

Tabela 5: Estimativas dos efeitos dos parâmetros analisados concentração do melão e tempo de cultivo do inóculo, e concentrações de sacarose e do inóculo, sobre as respostas concentração (g/L) de GF₂, GF₃ e GF₄, no processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

	GF2 (g/L)						GF3 (g/L)						GF4 (g/L)					
	24h		48h		72h		24h		48h		72h		24h		48h		72h	
	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor	Ef.	p-valor
<i>Média</i>	198	<0,001	159	<0,001	129	<0,001	55,5	<0,001	94,7	<0,001	103	<0,001	5,88	<0,001	29,4	<0,001	45,7	0,001
<i>X1(M)</i>	-34,0	0,151	-63,5	0,056	-64,5	0,087	29,5	0,050	44,0	0,098	11,2	0,521	7,66	0,010	36,0	0,015	35,8	0,124
<i>X2(t)</i>	-14,7	0,508	13,5	0,640	-4,2	0,901	0,328	0,980	26,1	0,296	7,16	0,678	1,01	0,657	1,81	0,877	18,6	0,396
<i>X3(S)</i>	34,2	0,148	92,5	0,012	89,9	0,027	-17,4	0,207	-33,6	0,189	-10,5	0,546	-3,50	0,152	-28,5	0,039	-18,7	0,391
<i>X4(I)</i>	28,7	0,215	-32,1	0,284	-18,3	0,590	33,2	0,033	5,86	0,807	17,1	0,335	5,20	0,049	16,6	0,183	10,3	0,631

Tabela 6: Resultado geral das análises dos efeitos dos parâmetros concentração do melão e tempo de cultivo do inóculo, e concentrações de sacarose e do inóculo, avaliados durante o planejamento fatorial fracionado, no processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium sp.*

		<i>T FOS</i>	<i>Rendimento</i>	<i>GF₂</i>	<i>GF₃</i>	<i>GF₄</i>
<i>X1</i>	<i>[ART] no melão (% m/v)</i>	P ns	P s	N s	P s	P s
<i>X2</i>	<i>Tempo cultivo inóculo (h)</i>	P ns	N ns	N ns	P ns	P ns
<i>X3</i>	<i>[Sacarose] (% m/v)</i>	P ns	P ns	P s	N ns	N s
<i>X4</i>	<i>[Inóculo] (% v/v)</i>	P s	P s	N ns	P s	P ns

Nota: P: positivo; N: negativo; ns: não significativo; s: significativo.

Comumente são estudados mecanismos para otimizar e melhorar a produção de FOS, diminuir custos e aumentar a eficiência dos sistemas. Na maioria dos estudos, a conversão da sacarose em FOS é catalisada por enzimas microbianas livres e imobilizadas, sendo os resultados mais expressivos de obtenção de frutooligossacarídeos totais, produtividade e rendimento variam entre 200 a 300 g/L, com rendimentos entre 50 a 70 % e produtividade de 10 g/L/h (VEGA-PAULINO & ZÚNIGA- HANSEN, 2012; AGUIAR-OLIVEIRA, RODRIGUES & MAUGERI, 2012);

Entretanto, muito pouco estudo é citado na literatura utilizando células livres e íntegras de micro-organismos para converter sacarose em FOS, em substratos contendo altas concentrações de sacarose. Os valores de síntese de frutooligossacarídeos apresentados nesta etapa de estudo, prévia às condições otimizadas, demonstraram resultados muito expressivos, apresentado uma síntese de FOS totais de 333 g/L e taxas de conversão de 0,61 ou 61% de rendimento, representando uma produtividade de 13,9 g/L.h as 24 horas. Nas 48 horas foram obtidos valores de 354 g/L, e taxas de conversão de 0,64 ou 64% de rendimento, representando uma produtividade de 7,4 g/L.h.

Katapodis *et al.* (2004) em processo de fermentação submersa com o fungo osmofílico *Sporotrichum thermophile* produziu 12,5 g/L de FOS em fermentação submersa em 250 g/L de sacarose durante o crescimento do fungo.

Uma vez que é a produção de FOS é estimulada pelas altas concentrações de sacarose no meio (YUN *et al.*, 1990), é essencial para o micro-organismo se manter ativo quando exposto ao estresse de alta pressão osmóticas no meio (Katapodis *et al.*, 2004).

Sendo assim, foram acompanhados também, a taxa de crescimento microbiana durante o experimento. A Figura 1 apresenta as concentrações celulares em biomassa seca durante o processo de biotransformação da sacarose em meios com altos teores de substrato.

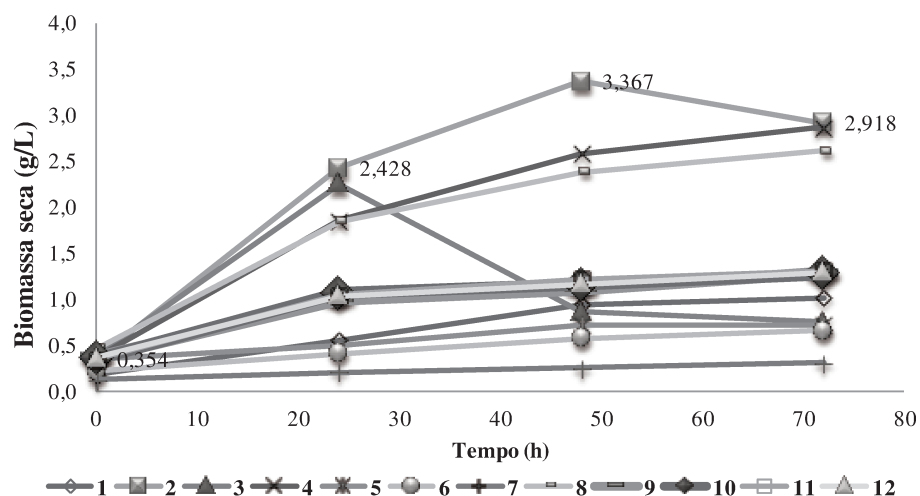


Figura 1: Valores de biomassa seca (g/L) obtidos durante as 72h da etapa de biotransformação da sacarose em FOS no experimento do planejamento fatorial fracionado.

Com excessão ao tratamento 3, foi possível notar que houve um incremento de biomassa em todos os tratamento durante as 72 horas de processo, indicando que mesmo em altas concentrações de sacarose (350 a 550 g/L) o micro-organismo mantém as suas atividades metabólicas. Além disso, o seu

crescimento resulta diretamente em um aumento na atividade da enzima frutossiltransferase, já que é principal micro-organismo produtor da enzima frutossiltransferase tanto intra com extracelular (SHIN *et al.*, 2004; YUN *et al.*, 1992; HIDAKA *et al.*, 1988).

Por meio deste planejamento, foi possível avaliar os efeitos das 4 variáveis estudadas concentração do melaço e tempo de cultivo, ambos na etapa de propagação do inóculo, e as concentrações de sacarose e do inóculo na etapa de biotransformação da sacarose em FOS.

A concentração de ART no melaço se mostrou significativa e com efeito positivo para produção de GF₃ e GF₄, portanto foi estipulado o valor de 10% de ART (maior nível avaliado) para as continuidades experimentais. Este efeito provavelmente se deve pela maior concentração celular produzidas em meios com 10% de ART, conforme ilustrado pela Figura 2.

O tempo de cultivo do inóculo não apresentou efeito significativo, sendo assim, foi estabelecido o tempo de 48h de incubação, cujo foi o menor nível avaliado no delineamento e que apresenta a concentração celular de $1,0 \cdot 10^8$ cél/mL, atingida em todos os tratamentos do inóculo, conforme apresenta a Figura 2, mostrando-se suficiente para iniciar o processo.

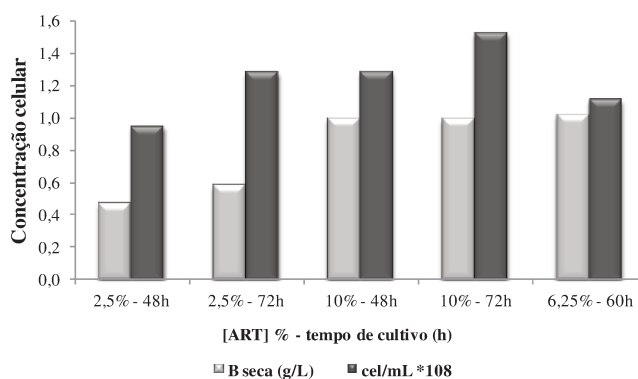


Figura 2: Valores de biomassa seca (g/L) e de concentração celular obtidos durante a etapa de cultivo do inóculo do *Aureobasidium pullulans* em meio composto por melaço com diferentes concentrações de ART e por diferentes períodos de incubação.

A concentração de sacarose no meio apresentou um efeito positivo para a produção de frutooligossacarídeos totais, sendo mais marcante para a formação de GF₂, e exercendo um efeito negativo sobre a formação dos oligossacarídeos de maior cadeia. Sugere-se que o isso ocorra devido ao mecanismo de formação dos oligossacarídeos, no qual são formados primeiramente os oligossacarídeos menores e os maiores em decorrência da formação dos intermediários, sendo assim, quanto maior a concentração de sacarose inicial, maior será a formação de GF₂ e maior será o tempo necessário para a conversão e obtenção dos oligossacarídeos maiores como o GF₃ e GF₄;

Aguiar-Oliveira *et al.* (2012) verificaram o efeito da concentração de sacarose na bioconversão de sacarose em FOS por meio da enzima frutossiltransferase de *Rodothorula sp.* imobilizada e conferiu que a concentração de sacarose no meio apresentou um efeito positivo para a formação de GF₂ e negativo para os demais parâmetros. Além disso, verificou também que a concentração de sacarose inicial aumenta a taxa de conversão de sacarose em FOS nas primeiras horas do processo, etapa na qual o GF₂ é formado, justificando assim, a proposição levantada nesse estudo.

A concentração de inóculo apresentou um efeito positivo para a maioria das respostas, com exceção ao GF₂. A hipótese sugerida para isto é que a maior concentração desse fator associa-se a maior concentração de enzima, tendo como consequência uma maior velocidade da reação em cadeia, a qual se foram os FOS de maior cadeia (GF₃ e GF₄), diminuindo a concentração de GF₂.

Outros estudos na literatura indicam o mesmo efeito, uma vez que quanto maior a concentração de células, maior será a quantidade de enzima disponível e ativa na reação de transfrutossilacção da sacarose (Ning *et al.*, 2012; Fialho *et al.*, 2013).

3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os resultados obtidos a partir desse planejamento e sua matriz estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e respostas experimentais do estudo dos efeitos das concentrações do melão e tempo de cultivo do inóculo, e concentrações de sacarose e do inóculo sobre o processo da biotransformação da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium pullulans*.

TRAT	Variáveis		GF2 (g/L)				GF3 (g/L)				GF4 (g/L)				T FOS (g/L)				Rendimento (%)			
	X1 (S)	X2 (I)	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
1	-1 (444)	-1 (16,5)	124	85,2	44,3	52,7	106	142	90,0	114	0,0	43,7	50,7	87,9	230	271	185	255	51,9	61,0	41,7	57,4
2	1 (656)	-1 (16,5)	230	146	86,9	97,0	106	146	137	189	0,0	33,5	46,5	91,5	336	325	271	377	51,2	49,6	41,2	57,5
3	-1 (444)	1 (23,5)	96,3	53,2	35,4	29,3	126	110	73	57,1	0,0	52,7	57,1	63,8	223	215	166	150	50,2	48,6	37,3	33,9
4	1 (656)	1 (23,5)	205	132	76,4	60,4	146	187	149	128	0,0	54,7	71,8	88,5	351	374	297	277	53,5	56,9	45,3	42,3
5	-1,41(400)	0 (20)	72,9	49,4	31,0	24,3	108	108	63,3	44,6	30,9	56,6	56,5	54,2	212	214	151	123	53,0	53,6	37,7	30,8
6	1,41(700)	0 (20)	224	187	67,5	68,5	112	197	106	131	0,0	45,8	40,9	65,9	336	430	214	265	48,1	61,4	30,6	37,9
7	0 (550)	-1,41 (15)	178	116	82,8	44,2	115	161	162	92,3	0,0	41,9	74,9	60,9	293	319	319	197	53,4	57,9	58,1	35,9
8	0 (550)	1,41 (25)	147	78,3	56,5	35,2	168	154	123	68,6	38,7	67,7	91,4	70,7	353	300	270	175	64,2	54,5	49,2	31,7
9 (C)	0 (550)	0 (20)	149	110	79,1	43,0	120	178	166	90,8	0,0	57,7	88,4	70,2	270	346	334	204	49,0	62,9	60,6	37,1
10 (C)	0 (550)	0 (20)	186	90,3	84,5	45,0	132	133	175	94,1	0,0	41,3	89,4	69,3	318	265	349	208	57,9	48,1	63,4	37,9
<i>Média</i>	0 (550)	0 (20)	161	105	64,4	50,0	124	151	124	101	7,0	49,6	66,8	72,3	292	306	256	223	53,2	55,4	46,5	40,2

[T FOS]: Concentração de Frutooligossacarídeos totais (GF₂+GF₃+GF₄) em g/L; Rendimento FOS: ([T FOS]/[Sac_{in}])*100.

Os resultados mostraram um ótimo incremento na produção de FOS totais quando comparados ao planejamento fatorial. Os máximos valores obtidos para concentração de FOS foram de 353 g/L, representando um rendimento de 64% e uma produtividade de 14,7 g/L.h atingida nas primeiras 24 horas e 430 g/L, rendimento de 61% e produtividade de 9.0 g/L.h após 48 horas. O incremento de produtividade, quando comparado aos resultados do planejamento fatorial, representou um ganho de 0,8 g/L.h para as primeiras 24h e 1,6 g/L.h para às 48 horas. Outro fator importante a ser observado foi que a concentração de cada frutooligossacarídeo formação apresentou valores muito mais elevados quando comparados aos experimentos anteriores. A Figura 3 a 6 ilustra a produção total e individual de frutooligossacarídeos (GF₂, GF₃ e GF₄) a partir da sacarose utilizando-se *Aureobasidium pullulans*, durante as 96 horas de incubação no experimento de DCCR.

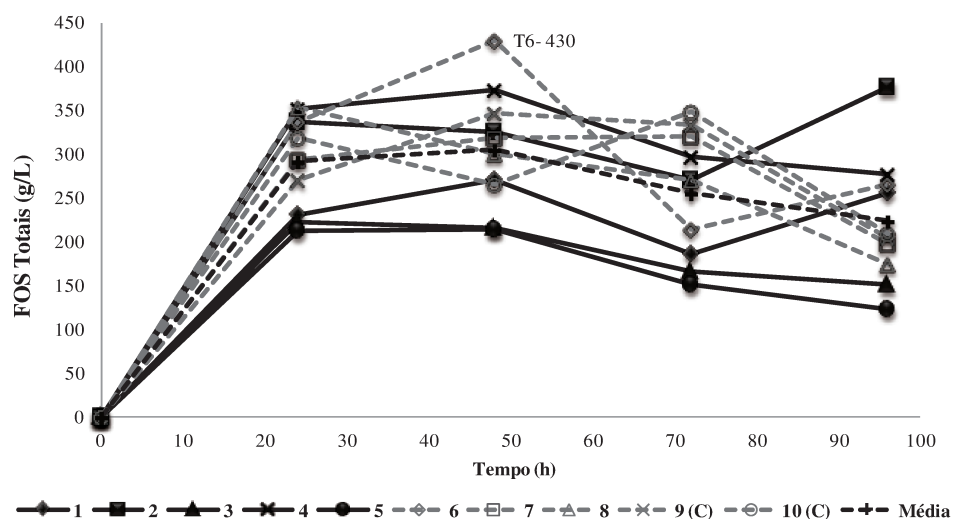


Figura 3: Produção total de FOS a partir da biotransformação da sacarose pelo *Auresobasidiudm sp.* durante 96 horas de incubação a 30°C e 150 rpm do planejamento de DCCR.

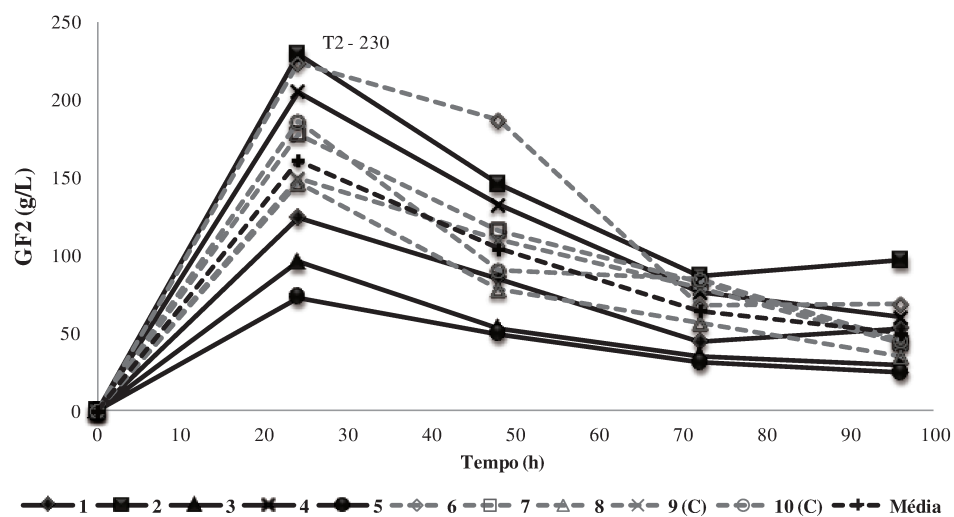


Figura 4: Produção total de GF₂ a partir da biotransformação da sacarose pelo *Auresobasidium sp.* durante 96 horas de incubação a 30°C e 150 rpm do planejamento de DCCR.

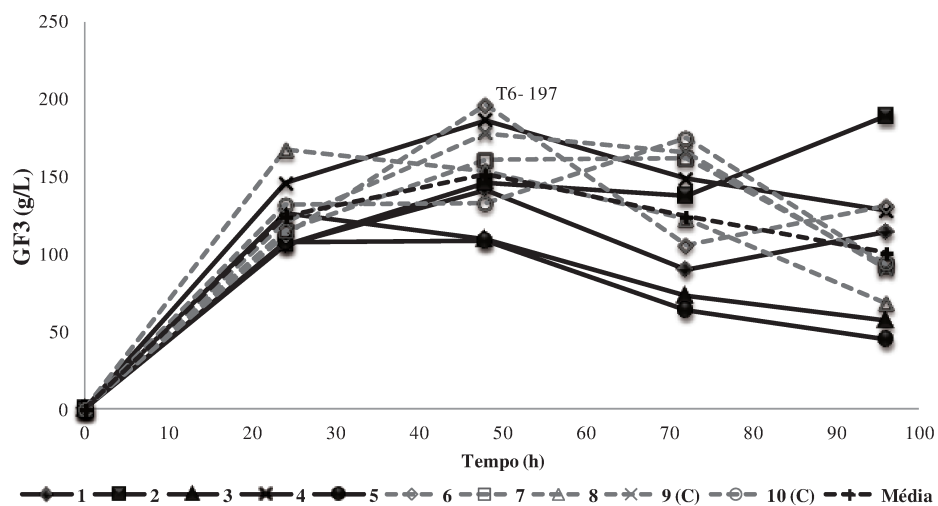


Figura 5: Produção total de GF₃ a partir da biotransformação da sacarose pelo *Auresobasidium sp.* durante 96 horas de incubação a 30°C e 150 rpm durante o planejamento de DCCR.

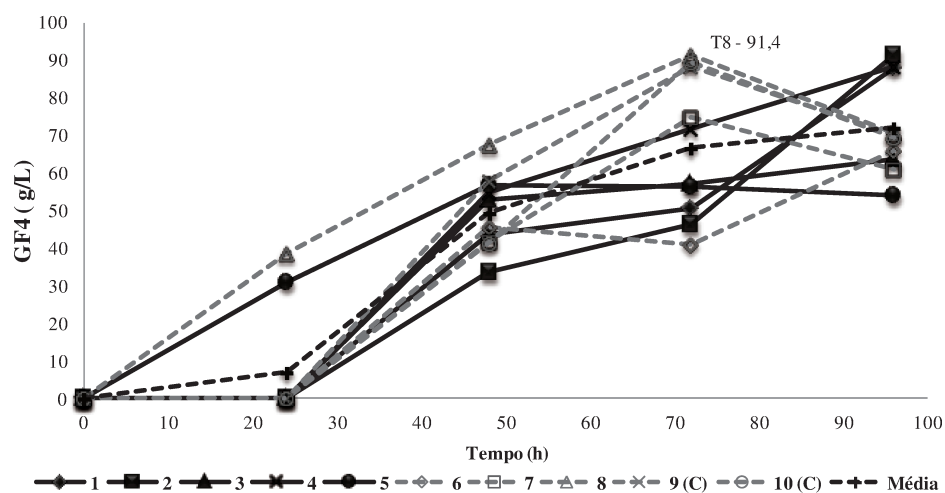


Figura 6: Produção total de GF₃ a partir da biotransformação da sacarose pelo *Auresobasidium sp.* durante 96 horas de incubação a 30°C e 150 rpm durante o planejamento de DCCR.

Durante o experimento, foram acompanhados o crescimento microbiano através da análise de densidade ótica juntamente com a atividade enzimática em cada tempo de amostragem. O indicativo de que o aumento da biomassa estaria associado também ao aumento da atividade enzimática, como mencionado nos resultados do planejamento fatorial, foi comprovado, conforme os valores apresentados a seguir na Tabela 8 e ilustrados pela Figura 7.

Tabela 8: Valores de crescimento celular estimados pela determinação da biomassa seca e de atividade enzimática da enzima frutossiltransferase durante a conversão da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium pullulans* no planejamento DCCR.

TRAT	Variáveis		Atividade enzimática (U/mL*min)						Biomassa seca (g/L)					
	X1 (S)	X2 (I)	0h	24h	48h	72h	96h	Δ	0h	24h	48h	72h	96h	Δ
1	-1	-1	40,4	47,2	48,9	44,0	44,4	3,99	0,71	1,04	1,36	1,32	1,45	0,738
2	1	-1	37,3	46,0	48,5	56,2	60,8	23,6	0,68	0,54	0,82	0,77	1,05	0,369
3	-1	1	47,7	53,0	45,0	59,3	93,6	45,8	1,39	1,72	2,53	2,47	2,76	1,375
4	1	1	48,5	62,9	56,9	54,6	95,7	47,2	1,34	1,03	1,49	1,51	1,76	0,422
5	-1,41	0	43,2	50,6	56,9	56,0	103	59,8	1,20	1,90	1,64	2,61	3,14	1,936
6	1,41	0	38,3	64,7	36,0	41,0	42,1	3,83	1,16	1,04	0,87	0,90	1,03	-0,135
7	0	-1,41	39,0	58,6	42,5	51,5	72,1	33,1	0,64	0,89	0,91	1,00	1,18	0,537
8	0	1,41	49,8	59,3	52,6	38,1	93,2	43,4	1,80	2,22	1,89	1,89	2,12	0,320
9 (C)	0	0	40,8	57,6	52,1	46,2	98,8	58,0	1,02	1,39	0,95	1,31	1,61	0,585
10 (C)	0	0	38,6	61,6	29,1	46,2	92,7	54,1	1,01	1,22	0,81	1,27	1,62	0,613
Média	0	0	44,4	56,2	46,8	49,3	79,6	35,3	1,10	1,30	1,33	1,51	1,77	0,676

Δ: representa o incremento nos valores de biomassa e atividade enzimática durante o período de 96h, calculado através da subtração entre o valor referente às 96 horas e 0 horas.

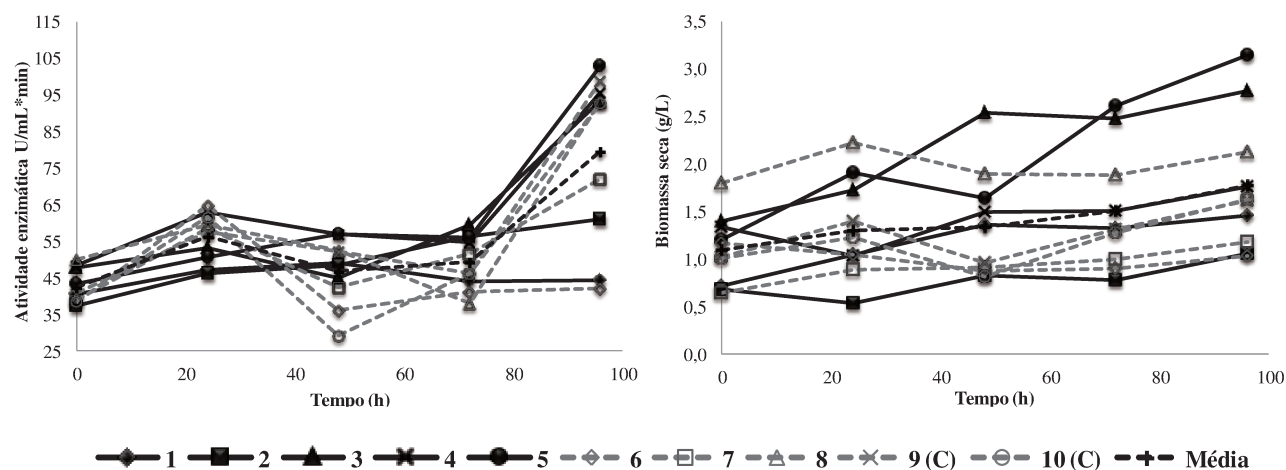


Figura 7: Gráficos de atividade enzimática e biomassa seca durante o processo.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se perceber que a atividade enzimática e a biomassa aumentaram no decorrer do processo e os máximos valores obtidos foram de 103 U/mL.min 3,14 g/L de biomassa seca para o tratamento 5, o qual continha a menor concentração de sacarose inicial de 400 g/L. Todos os tratamentos apresentaram crescimento celular durante o período, com exceção do tratamento 6, cujo continha máxima concentração de sacarose inicial (700 g/L), o que implicou negativamente no desenvolvimento celular advertido pelo valores de crescimento celular e atividade enzimática que permaneceram constantes durante o período.

Os dados apresentados foram analisados estatisticamente, para cada resposta nos tempos de máxima produção atingida. Assim a resposta concentração de frutooligossacarídeos totais (T FOS) foi analisada às 48 e 72 horas, GF₂ às 24 horas, GF₃ às 48 horas e GF₄ às 72 horas. Os resultados possibilitaram propor modelos matemáticos para cada uma das respostas, sendo considerados significativos os parâmetros que apresentaram p-valores menores que 0,1%, conforme apresentados na tabela de coeficientes de regressão (Tabela 9). Os termos não significativos foram adicionados aos resíduos para se calcular a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 10, com o objetivo de verificar a validade do modelo.

Tabela 9: Coeficientes de regressão para as respostas concentração de FOS totais, GF₂, GF₃ e GF₄ para o processo de biotransformação da sacarose pela linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

Fatores	GF ₂ (24h)			GF ₃ (48h)			GF ₄ (72h)			FOS Total (48h)			FOS Total (72h)		
	C. Reg	E. Pd	p-valor	C. Reg	E. Pd	p-valor	C. Reg	E. Pd	p-valor	C. Reg	E. Pd	p-valor	C. Reg	E. Pd	p-valor
<i>Média</i>	168	10,2	< 0,001	156	13,5	< 0,001	88,9	6,30	< 0,001	305	25,4	< 0,001	341	19,5	< 0,001
<i>S (L)</i>	53,6	5,10	< 0,001	25,8	6,73	0,019	-1,43	3,15	0,674	64,7	12,7	0,007	38,4	9,7	0,017
<i>S (Q)</i>	-7,57	6,74	0,324	-3,84	8,90	0,688	-22,5	4,17	0,006	3,46	16,8	0,846	-81,6	12,9	0,003
<i>I (L)</i>	-12,0	5,10	0,077	-0,13	6,73	0,985	6,87	3,15	0,095	-4,16	12,7	0,759	-7,81	9,7	0,468
<i>I (Q)</i>	-0,50	6,74	0,944	-1,41	8,90	0,881	-5,24	4,17	0,277	-2,86	16,8	0,873	-25,4	12,9	0,120
<i>S x I</i>	0,85	7,21	0,911	18,2	9,51	0,129	4,73	4,46	0,348	25,89	17,9	0,222	11,5	13,8	0,452

C.Reg: Coeficiente de Regressão; E.Pd: Erro Padrão.

Tabela 10: ANOVA para as respostas concentração de FOS totais (T FOS), de GF₂, GF₃ e GF₄ para o processo de biotransformação da sacarose pela linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

Respostas	R ²	Regressão		Falta de Ajuste		p-valor
		F cal	F tab	F cal	F tab	
<i>GF₂ - 24h</i>	95,5	74,2	3,26	0,111	58,2	< 0,001
<i>GF₃ - 48h</i>	65,2	15	3,46	0,26	58,9	0,0047
<i>GF₄ - 72h</i>	83	17	3,26	180	58,2	0,002
<i>T FOS - 48h</i>	80,5	33	3,46	0,21	58,9	< 0,001
<i>T FOS - 72h</i>	85	20	3,26	9,86	58,2	0,0013

A tabela de ANOVA (Tabela 10) demonstrou que o modelo quadrático ajustado para as respostas do processo são satisfatórias. O valor de F calculado mostrou-se maior que o respectivo valor tabelado, enquanto que o p-valor do modelo mostrou-se significativo, variando de 0,0047 a menor que 0,001 para as repostas. O valor de R² acima de 80% para sistemas biológicos é totalmente aceitável (RODRIGUES & IEMMA, 2009), sendo assim, foram definidos 4 modelos codificados e

reparametrizados, os quais foram retirados dos modelos os parâmetros não significativos para este processo, que relacionam as respostas avaliadas em função das variáveis estudadas.

- Modelo 1: Concentração de GF₂ (g/L) para as 24h de processo = $168 + 53,6 \cdot S - 12 \cdot I$ (R²:95,5)

- Modelo 2: Concentração de GF₄ (g/L) para as 72h de processo = $88,9 - 22,5 \cdot S^2 + 6,87 \cdot I$ (R²:83)

- Modelo 3: Concentração de FOS totais para as 48h de processo: $305+64,7.S$ (R²:80,5)

- Modelo 4: Concentração de FOS totais para as 72h de processo = $341 + 38,4 \cdot S - 81,6 \cdot S^2$ (R²:85)

Os modelos puderam ser definidos para cada uma das respostas, devido ao mecanismo da síntese de GF₂, GF₃ e GF₄ ocorrer em cadeia e em diferentes tempos (YUN, 1999), indicando que o trabalho de otimização da produção de oligossacarídeos totais possibilitou, indiretamente, obter valores otimizados para cada um dos compostos intermediários da reação. Com relação ao intermediário GF₃, não foi possível definir um modelo uma vez que o valor do coeficiente de regressão (R²) de 65,5 foi muito inferior ao aceitável para sistemas biológicos. As Figuras de 8 a 11 apresentam as superfícies de respostas e as curvas de contornos obtidas para cada modelo.

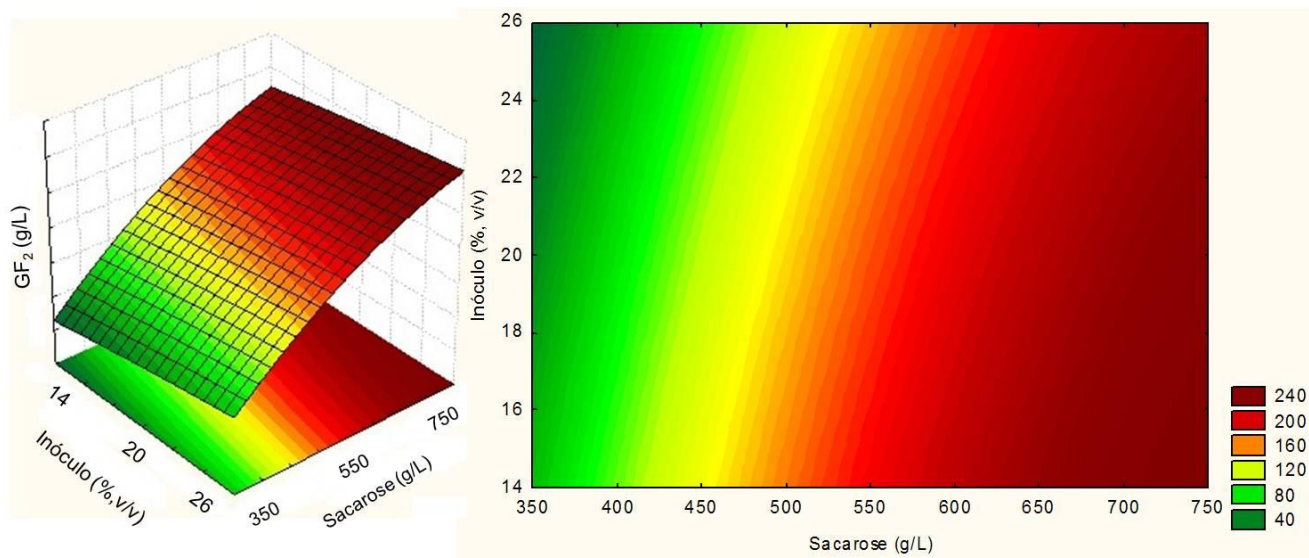


Figura 8: Superfície de resposta e contorno da produção de GF_2 (g/L) pelo *Aureobasidium pullulans* após 24h de incubação em função da concentração de inóculo e de sacarose iniciais no meio.

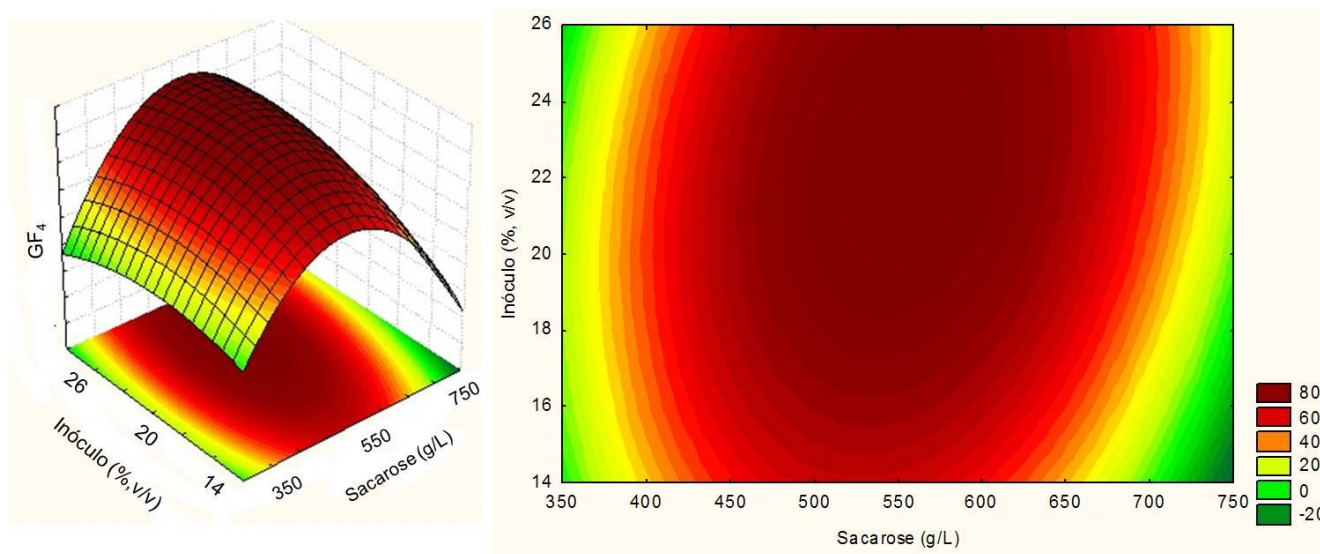


Figura 9: Superfície de resposta e contorno da produção de GF_4 (g/L) pelo *Aureobasidium pullulans* após 72h de incubação em função da concentração de inóculo e de sacarose iniciais no meio.

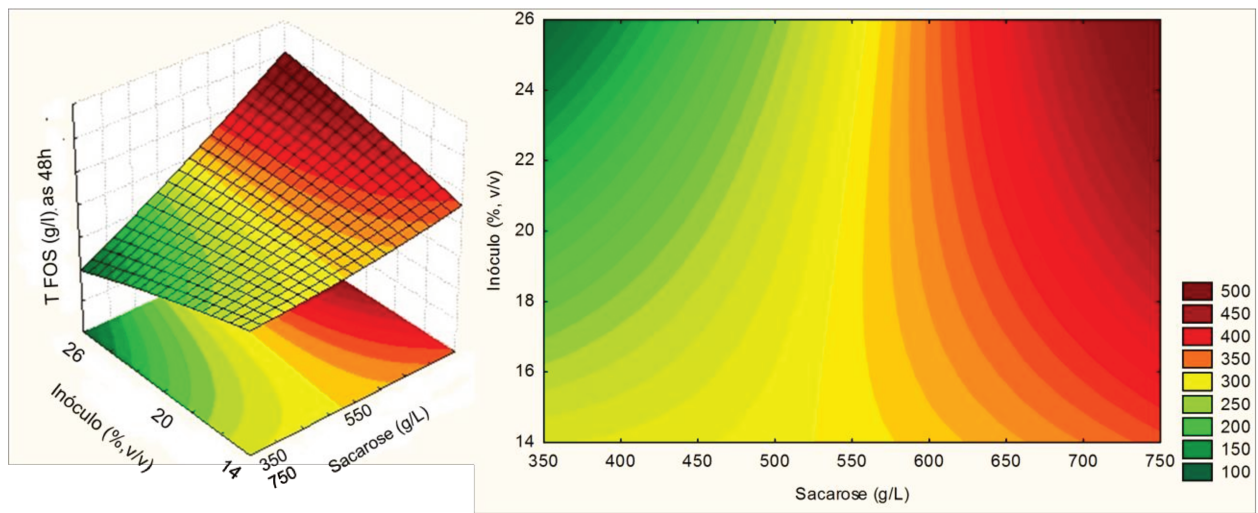


Figura 10: Superfície de resposta e contorno da produção de FOS totais (g/L) pelo *Aureobasidium pullulans* após 48h de incubação em função da concentração de inóculo e de sacarose iniciais no meio.

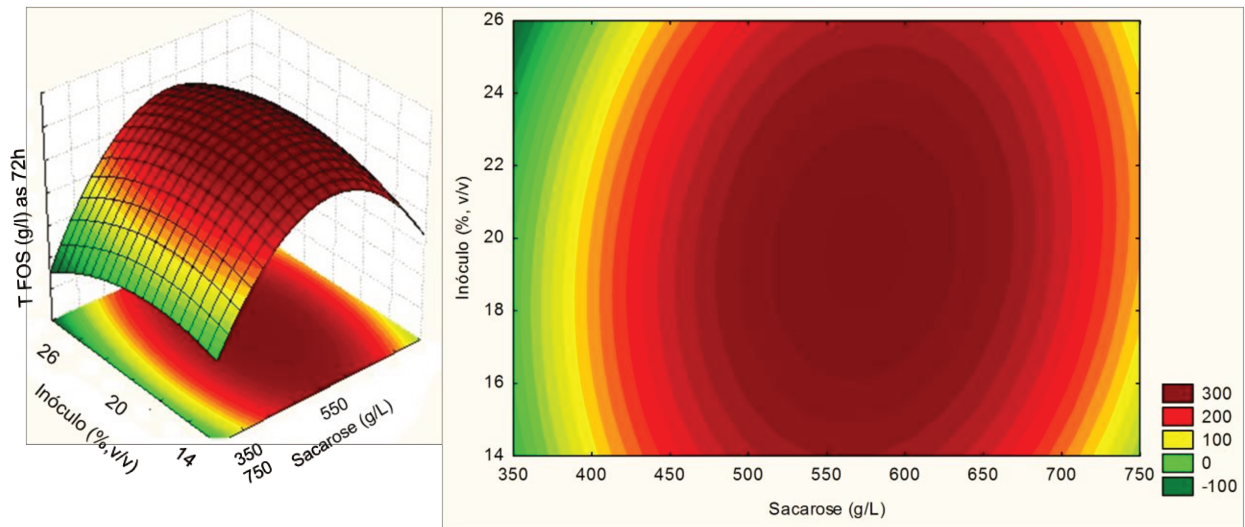


Figura 11 Superfície de resposta e contorno da produção de FOS totais (g/L) pelo *Aureobasidium pullulans* após 72h de incubação em função da concentração de inóculo e de sacarose iniciais.

As superfícies das respostas para GF₂, GF₄ e FOS totais após 72 horas de incubação exibiram pontos de produtividade máxima dentro dos níveis estudados, os quais foram definidos para a síntese de GF₂ na faixa de 650 a 750 g/L de sacarose e de 14% a 23% de inóculo. Para GF₄ na faixa de 490 a 620 g/L de sacarose e 19 a 25 % de inóculo. E por último, para frutooligossacarídeos totais na faixa de 500 a 650 g/L de concentração de sacarose e entre 16 e 23% a concentração de inóculo.

Os modelos foram validados seguindo as mesmas condições dos experimentos descritas no planejamento DCCR, contudo fixando as concentrações de sacarose em 440g/L (valor codificado de -0,94) e inóculo em 18% (valor codificado de -0,56) respectivamente. Os valores preditos pelos modelos e obtidos experimentalmente estão descritos na Tabela 11 abaixo:

Tabela 11: Valores experimentais e preditos pelos modelos obtidos no experimento de validação do modelo para o processo de biotransformação de sacarose em FOS pela linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

	<i>Respostas</i>	Y^{\wedge} (<i>Predito</i>)	Y (<i>experimental</i>)	<i>E. Ajuste</i>	<i>E. Rel (%)</i>
<i>Modelo 1</i>	<i>GF₂</i>	124	161	36,2	22,5
<i>Modelo 2</i>	<i>GF₄</i>	65,1	85,9	20,7	24,1
<i>Modelo 3</i>	<i>T FOS 48h</i>	244	273	28,4	10,4
<i>Modelo 4</i>	<i>T FOS 72h</i>	233	246	13,2	5,36

Condição experimental 450g/L de sacarose e 18% de inóculo.

A melhor correlação entre os valores foi obtida pelo modelo 4, para frutooligossacarídeos totais produzidos, pois as condições experimentais se apresentaram mais próximas do ponto ótimo para este modelo. Contudo, em outra condição, que se aproxima do ótimo para todos os modelos, os erros experimentais diminuíram, como por exemplo, na condição +1 de sacarose e +1 para inóculo, representando em valores reais 656 g/L de sacarose e 23,5% de inóculo.

Esta condição foi realizada experimentalmente durante o experimento de DCCR, representada pelo tratamento 4. As respostas preditas pelos modelos foram calculadas para esta condição e comparadas aos dados experimentais obtidos durante o experimento de DCCR, como apresenta a Tabela 12.

Tabela 12: Valores experimentais obtidos no tratamento 4 durante o planejamento de DCCR e valores preditos pelos modelos para o processo de biotransformação de sacarose em FOS pela linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

	Respostas	Y^{\wedge} (Predito)	Y (experimental)	E. Ajuste	E. Rel (%)
Modelo 1	GF_2	210	205	-4,14	-2,01
Modelo 2	GF_4	73,3	71,8	-1,47	-2,05
Modelo 3	T FOS 48h	370	374	4,02	1,08
Modelo 4	T FOS 72h	298	297	-0,75	-0,253

Condição experimental: 656 g/L de sacarose e 23,5% de inóculo.

A boa correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo e os baixos valores de falha de ajuste e de erro relativo, apresentados na Tabela 12, confirmam a adequação dos modelos e das superfícies de resposta que apontam a faixa ótima para o processo de biotransformação de sacarose através do micro-organismo osmofílico *Aureobasidium pullulans*.

O experimento de validação de modelo também permitiu o melhor entendimento do processo uma vez que foram acompanhados os parâmetros de consumo de sacarose e síntese dos oligossacarídeos, atividade enzimática e crescimento microbiano.

Tabela 13: Parâmetros avaliados durante o experimento de validação do modelo (440g/L de sacarose e 18% de inóculo) para o processo de biotransformação da sacarose em FOS pela linhagem *Aureobasidium pullulans*.

	<i>Parâmetros</i>	<i>Validação modelo</i>			
		<i>0h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<i>1</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	0	98,4	131	75,7
<i>2</i>	<i>Frutose (g/L)</i>	0	7,04	11,4	18,8
<i>3</i>	<i>Sacarose (g/L)</i>	450	42,7	27,9	9,53
<i>4</i>	<i>GF₂ (g/L)</i>	0	161	68,2	51,5
<i>5</i>	<i>GF₃ (g/L)</i>	0	100	134	109
<i>6</i>	<i>GF₄ (g/L)</i>	0	13,2	70,3	85,9
<i>7</i>	<i>T FOS (g/L)</i>	0	274	273	246
<i>8</i>	<i>Produtividade (g/L.h)</i>	0,385	11,4	5,69	3,42
<i>9</i>	<i>Rendimento (%)</i>	2,05	60,9	60,6	54,7
<i>10</i>	<i>Ativ Enz. (U/mL.min)</i>	26	61	74	91
<i>11</i>	<i>Biomassa seca (g/L)</i>	0,422	2,60	3,27	3,92
<i>12</i>	<i>Taxa crescimento</i>	1	6,17	7,76	9,29
<i>13</i>	<i>Incremento Ativ Enz.</i>	1	2,35	2,85	3,50

Nota: Os valores de taxa de crescimento (12) e incremento de atividade enzimática (13) foram calculados pelo valor obtido no tempo de amostragem dividido pelo valor inicial às 0h de processo.

Os dados apontam um incremento na atividade enzimática e na biomassa microbiana durante o processo demonstrando a manutenção da viabilidade celular e a atividade enzimática durante o período, conforme representados na Figura 12 demonstrando forte correlação entre os dados.

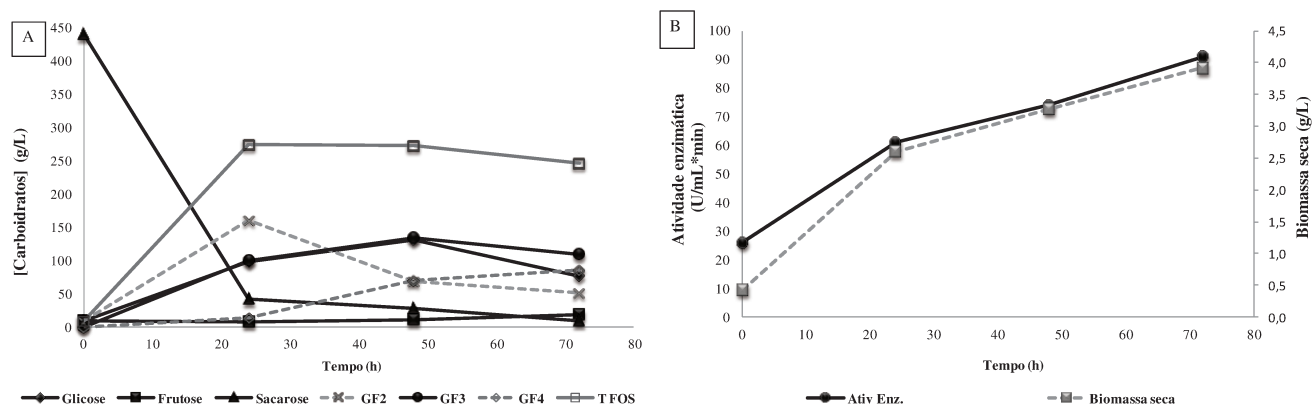


Figura 12: Gráficos A: conversão da sacarose em FOS; B: atividade enzimática e biomassa microbiana, durante o experimento de validação de modelo do processo de biotransformação da sacarose em FOS pela linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

Shin *et al.* (2004) utilizou 3 diferentes linhagens de *A. pullulans* e avaliou a a atividade da enzima frutossiltransferase intracelular e extracelular durante um cultivo em 100 g/L de sacarose com suplementação de sais, incubados 28°C, 100 rpm por 72 horas correlacionou positivamente o crescimento celular com o aumento da atividade enzimática total, tanto intracelular quanto extracelular para todas as linhagens. Além disso, o estudo evidenciou também que, quando as células são utilizadas como biocatalizadores da transformação da sacarose em FOS, ambas as enzimas estão ativas como catalizadores.

Apesar dessa evidencia, poucos estudos foram realizados utilizando o processo de biotransformação da sacarose utilizando células íntegras.

Recentemente, Domingues *et al.* (2012) utilizando a técnica de Planejamento Experimental para otimizar a síntese de FOS pelo micro-organismo *Aureobasidium pullulans* obteve rendimentos de 64,7% em 48 horas, porém o estudo não especificou valores de concentração de frutooligossacarídeos e tipo de oligossacarídeos produzidos. Ning e colaboradores (2010) realizaram um estudo comparativo

da produção de neo-frutooligossacarídeos a partir de *Xanthophyllomyces dendrorhous* com células livres e células imobilizadas obtendo 227,7 g/L em 4 horas e um rendimento de 56% e 235,56 g/L em 15 horas de processo com 59% de rendimento para células livres e imobilizadas, respectivamente.

Prata e colaboradores (2010) utilizaram o processo de obtenção direta de FOS a partir de células de *Penicillium expansum*, o qual, em condição não otimizadas alcançou um rendimento de 58% e uma produtividade de 3,25 g/L.h de FOS a partir de sacarose.

Agruiar-Oliveira, Rodrigues e Maugeri (2012) em uma pesquisa utilizando metodologia de superfície de resposta para síntese de FOS totais apresentaram ótimos rendimentos e altas concentrações dos produtos, com uma produtividade de 12 g/L.h e 58% de rendimento em 24 horas a partir de 500 g/L de sacarose utilizando a enzima frutossiltransferase imobilizada de *Rhodotoula sp.*

4. CONCLUSÕES

Inúmeros trabalhos tem sido realizados para otimizar a síntese de frutooligossacarídeos através de enzimas microbianas das mais variadas espécies. Contudo, há poucos trabalhos relacionados à otimização de processo utilizando células íntegras microbianas e que permitem a síntese em apenas uma etapa de processo sem que seja necessária a produção e purificação da enzima.

Esta pesquisa viabilizou o cultivo do inóculo microbiano em meio contendo melaço de usina de açúcar e álcool, o qual é um resíduo agroindustrial e de estimado valor de nutrientes. O seu emprego dispensou a utilização de suplementação com nutrientes essenciais para manter as células microbianas ativas durante o processo de bioconversão da sacarose em FOS.

Pela primeira vez foi realizado um estudo de otimização para a produção de FOS que englobou a otimização de cada um dos compostos intermediários da reação e não apenas FOS totais. A condição

otimizada para este processo foi definida entre 600 a 650 g/L de sacarose e de 20 a 23% de inóculo. Para as condições otimizadas foi possível atingir valores de máxima produção de GF₂ em 205 g/L as 24 horas, GF₃ em 187 g/L as 48 horas e GF₄ em 72 g/L as 72 horas. Para os FOS totais, os valores alcançados foram de 351, 374 e 297 g/L para as 24, 48 e 72 horas de incubação, respectivamente, representando uma produtividade de 14,6 g/L.h às 24 horas de processo. Além disso, o trabalho correlacionou dados como atividade enzimática e crescimento microbiano durante a produção, os quais permitiram sugerir aprimoramentos como um processo contínuo ou até mesmo do tipo batelada com ciclos celulares, uma vez que neste processo foi observado a manutenção da viabilidade celular e o constante crescimento microbiano acoplado ao aumento da atividade enzimática durante todo o período de incubação, mesmo em meios contendo alta pressão osmótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-OLIVEIRA, E., RODRIGUES, M.I., MAUGERI, F. Optimization of fructooligosaccharides synthesis by immobilized fructosyltransferase. **Current Chemical Biology**, v.6, n.1, p. 42-52, 2012.

ALMÉCIGA-DÍAZ, C.J. *et al.* Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. **Gene**, v. 484, p.26-34, 2011.

BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J.. Industrial carbohydrate biotransformations. **Carbohydrate Research**, n.343, p.1966-1979, 2008.

DOMINGUEZ, Ana. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p.1174-1179, 2012.

FIALHO, M. B. *et al.* Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. **Mycoscience**, v. 54, p.198-205, 2013.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52,n.5, p. 1181-1187, 1988.

KATAPODIS, P., *et al.* Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.378–382, 2004.

MADLOVA, A. *et al.* Biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides: the choice of microorganisms and optimization of process conditions. **Food Biotechnology**, v. 17, p.151-155, 2008.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p.287-298, 2004.

MUSSATO *et al.* Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.59, p.56-61, 2010.

MUSSATO *et al.*, 2013. Maximization of fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* under solid-state fermentation conditions. **Food Bioprocess Technology**, v.6, p.2128-2134, 2013.

NING, Y. *et al.*, Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7472–7478, 2010.

OLIVEIRA, A.J. *et al.* **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar.** Piracicaba: Fermentec-Fealq-Esalq, 1996. 89 p.

ONISH, H. Osmophilic yeasts. **Advances in Food Research**, v. 12, p.53-94, 1963.

PRATA, M.B. *et al.* Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p.837–840, 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, S2, p.S105-S110, 2013.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos.** 2nd ed. Campinas: Ed. Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v.39, p.753-758, 2004.

SHIN, H.T. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, n. , p.52-62, 2004.

VEGA-PAULINO, R.J.; ZÚNIGA-HANSEN, M.E. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p.44-51, 2012.

YOSHIKAWA, J., *et al.* Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.535–539, 2008.

YUN, Jong Won. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p.107-117, 1996.

CAPÍTULO 6

PRODUÇÃO CONTÍNUA DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM MEIO DE SACAROSE E ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE XAROPE DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO

Artigo a ser submetido no periodico Food Research International

CAPÍTULO 6

PRODUÇÃO CONTÍNUA DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM MEIO DE SACAROSE E ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE XAROPE DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO

RESUMO

A biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos pela linhagem *Aureobasidium pullulans*. foi conduzida em xarope de cana-de-açúcar como fonte alternativa de sacarose apresentando alto desempenho de conversão com valor de 54%. O processo também foi conduzido em biorreator de 7L utilizando meio contendo 450 g/L de sacarose inicial e 18% de inóculo. Inicialmente o sistema foi conduzido em batelada e após as 48 horas o processo passou a ser contínuo com taxa de diluição de $0,04.h^{-1}$, e foi conduzido por mais 72 horas, totalizando 120 horas de processo. A produtividade média foi de 9 g/L.h de frutooligossacarídeos totais representando uma concentração média de 228 g/L.

1. INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são moléculas de carboidratos compostos por oligômeros de frutose, sendo os mais conhecidos os que contêm de 2 a 4 grupamentos frutossil ligados entre eles por ligações do tipo β -2,1, contendo uma molécula de glicose da fase terminal da cadeia, denominados kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil-nistose (GF4) (YUN, 1996).

São compostos de alto valor comercial devido a sua vasta utilização na indústria de alimentos como substâncias adoçantes, não calóricas, não metabolizáveis quando ingeridos, e por apresentarem suas conhecidas propriedades prebióticas, promovendo seletivamente o crescimento de bactérias benéficas no intestino, em detrimento de bactérias prejudiciais. Em função dessa propriedade, indiretamente modulam o ambiente intestinal, gerando uma série de benefícios ao hospedeiro como melhora do funcionamento e diminuição do trânsito intestinal, aumento da absorção de minerais, diminuição do colesterol sérico, melhora no sistema imunológico, entre outras (YUN *et al.*, 1996).

Os FOS comercializados industrialmente têm sido produzidos a partir de sacarose utilizando enzimas de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* (YUN *et al.*, 1996; FIALHO *et al.*, 2013). Muitos estudos estão sendo realizados para aumentar a produtividade desses compostos e ao mesmo tempo diminuir o custo de produção. Uma alternativa para o abaixamento do custo do processo é a utilização de substratos alternativos para a produção de enzimas (CHEN *et al.*, 2011) e a utilização da produção em apenas uma etapa, como na fermentação submersa ou biotransformação. Desse modo, o cultivo do micro-organismo diretamente no meio com sacarose promove o crescimento do micro-organismo no meio e torna ativa a enzima responsável pela reação de transfrutossilacção, a qual é liberada constantemente no meio colaborando pela contínua transformação de substrato (KATAPODIS *et al.*, 2004)

A partir dos resultados obtidos na etapa de otimização da produção de FOS pela biotransformação da sacarose utilizando células íntegras de *Aureobasidium pullulans* (apresentadas no capítulo 5 desta tese), este estudo teve como objetivo a síntese de frutooligossacarídeos (FOS) em xarope de cana-de-açúcar, que é o caldo de cana concentrado, para aferir sua utilização como substrato

alternativo para a síntese de FOS, bem como avaliar o processo tendo como substrato a sacarose, em biorreator de 7L de capacidade em sistema contínuo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e cultivo do inóculo

O *Aureobasidium pullulans* foi previamente isolado de favo-de-mel e identificado pelo sequenciamento do DNA ribossômico 18S, cuja sequencia está disponibilizada no banco de dados GenBank com o número de acesso GQ246207, em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa.

A linhagem foi mantida em tubos inclinados em meio YEPD ágar contendo 2% de glicose, 1% extrato de levedura, 1% de peptona, 1,5% de ágar e ativada em 3 mL de meio YEPD caldo a 30°C por 24h. Após o crescimento, a cultura foi estriada em placa petri contendo YEPD ágar e incubada por 48h a 30°C. Uma alçada da cultura em meio sólido foi transferida para o meio de cultivo do inóculo composto de melaço de usina de açúcar e água contendo 10 % de açúcares redutores totais (ART). O melaço utilizado nos experimentos foi previamente analisado quanto aos teores ART e continha 52,34%, dentre eles baixa concentração de glicose e frutose e alta concentração de sacarose. O inóculo foi cultivado em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio e incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Após o cultivo a suspensão foi analisada por densidade óptica a 600 nm para verificar a concentração celular e a concentração celular.

O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio e incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm por 48 horas. O inóculo foi analisado pó dendidade óptica

(D.O.) $\lambda = 600$ nm, a fim de verificar a concentração celular de $1,0 \cdot 10^8$ células/ mL, calculado pela curva de calibração previamente construída entre D.O. e concentração celular (cél/mL).

2.2. Biotransformação da sacarose utilizando xarope como substrato

A biotransformação da sacarose em frutooligossacarídeos foi conduzida em Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de caldo de cana-de-açúcar o qual foi previamente concentrado em rotavapor modelo RII, Buchi, e esterilizado a 121°C por 20 minutos a fim de reduzir o volume e concentrar os açúcares que inicialmente continham: 10,2% de ART e após concentrado 34% de ART.

O inóculo foi adicionado perfazendo 18% do volume final do meio. A incubação foi realizada sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C por um período de 72 horas com amostragens realizadas a cada 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3. Biotransformação da sacarose em reator de bancada

A biotransformação foi conduzida em biorreator de bancada modelo Bioflo & Celligen 310, New Brunswick, com capacidade de 7L, contendo um volume de 4L de meio constituído por 450 g/L de sacarose. O meio foi autoclavado diretamente na cuba do biorreator a 121°C por 20 minutos e o inóculo foi adicionado perfazendo 18% do volume final do meio. As condições de operação foram mantidas a temperatura de 30°C , 150 rpm de agitação e 1 vvm de aeração. Primeiramente foi mantido um sistema do tipo batelada até às 48 horas, ponto em que a produção de frutooligossacarídeos atinge seu máximo de acordo os experimentos anteriores e de validação, apresentado no capítulo 5.

Após esse período, foi realizado um sistema contínuo, o qual foi adicionado meio estéril contendo 450 g/L de sacarose, com o auxílio de uma bomba peristáltica a uma vazão de 2,8

mL/min, resultando numa taxa de diluição D de $0,04.h^{-1}$. Outra bomba peristáltica foi acoplada ao sistema a fim de manter a mesma vazão de entrada e saída do sistema, mantendo-o com um volume constante de 4L. O sistema contínuo foi mantido por mais 72h, completando 3 trocas totais de volume do biorreator, realizadas a cada 24 horas. As amostragens foram realizadas a cada 12 horas durante todo o período do cultivo.

2.4. Análise dos frutooligossacarídeos produzidos

As análises dos FOS produzidos foram realizadas pelo sistema de cromatografia de íons acoplada ao detector amperiométrico pulsado (HPAEC-PAD), com a coluna Carbopac PA-100 a 30°C, volume de injeção de 25 μ L, fluxo de 1 mL/minuto, utilizando a bomba Single Grad Degas e o software de Automação Cromatográfica Chromeleon 7.0 CHM-1, da Dionex (USA).

As amostras coletadas durante o processo foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à inativação enzimática através de banho-maria em ebulição por 10 minutos. As amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em filtros com porosidade 0,22 μ m para a análise. Para a eluição dos açúcares, foi realizado um gradiente entre duas soluções: solução A (100 mM de hidróxido de sódio) e solução B (100 mM de hidróxido de sódio e 500 mM de acetato de sódio). Primeiramente, foi realizado um gradiente linear de 0 a 30% de B em A por 20 minutos, e em seguida foi realizada a etapa de limpeza e estabilização da coluna. Foram utilizados padrões de glicose, frutose e sacarose da marca Sigma e de frutooligossacarídeos: kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil-nistose (GF4) da Wako Pure Chemicals.

2.5. Avaliação da concentração celular e crescimento do micro-organismo

O crescimento do micro-organismo foi acompanhado a cada 12 horas de amostragem durante o processo. Para o crescimento foram realizadas leituras de densidade óptica a $\lambda = 600$ nm, e a concentração de celular foi calculada através da construção prévia curva de calibração entre os fatores densidade óptica x biomassa seca (g/L) para a linhagem de *Aureobasidium pullulans*.

A concentração celular (cél/mL) foi analisada através de leituras de densidade óptica a $\lambda = 600$ nm e convertida em concentração celular por meio da curva de calibração previamente construída entre densidade óptica x concentração celular (cél/mL).

A contagem foi realizada por microrcopia óptica em câmara de Neubauer e calculada pela seguinte fórmula, conforme metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1996).

$$\text{População (cél/mL)} = \frac{\text{Total de células} \times 4000 \times 1000 \times \text{diluição}}{\text{Total de retículos contados}}$$

2.6. Avaliação da atividade enzimática durante o processo

A atividade enzimática foi acompanhada a cada 12 horas de amostragem durante o processo.

Para mensurar a atividade enzimática total, a qual representa tanto a atividade da enzima intracelular como extracelular, uma alíquota de 0,2 mL de amostra da suspensão celular (contendo células e meio com enzima extracelular liberado durante o processo de biotransformação da sacarose) foi adicionada em 0,8 mL de substrato enzimático contendo 50% de solução de sacarose em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. A reação foi realizada a 55°C por 30 minutos e paralisada em banho-maria em ebulição por 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida pela quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por minuto. A glicose foi determinada a partir do reagente colorimétrico glicose oxidase (GOD/PAD) da Kovalent.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Síntese de FOS a partir de xarope de cana-de-açúcar

Os resultados obtidos neste experimento estão apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Parâmetros de produção de FOS a partir da biotransformação da sacarose pelo *Aureobasidium pullulans*, utilizando xarope de cana-de-açúcar como substrato alternativo.

<i>Xarope como substrato alternativo</i>					
<i>Parâmetros</i>		<i>0h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
<i>1</i>	<i>Glicose (g/L)</i>	22,5	77,2	78,6	143
<i>2</i>	<i>Frutose (g/L)</i>	40,8	15,2	16,9	14,5
<i>3</i>	<i>Sacarose (g/L)</i>	203	16,0	10,7	26,8
<i>4</i>	<i>GF2 (g/L)</i>	0,0	31,4	3,69	5,39
<i>5</i>	<i>GF3 (g/L)</i>	0,0	54,1	9,18	11,0
<i>6</i>	<i>GF4 (g/L)</i>	0,0	24,1	22,4	23,7
<i>7</i>	<i>TFOS (g/L)</i>	0,0	110	35,3	40,1
<i>8</i>	<i>Rendimento (%)</i>	3,5	53,9	17,3	19,7
<i>9</i>	<i>Produtividade (g/L.h)</i>	0,0	4,57	1,26	0,56
<i>10</i>	<i>Ativ Enz. (U/mL.min)</i>	17,0	65,4	68,5	94,1
<i>11</i>	<i>Biomassa seca (g/L)</i>	0,422	7,56	15,1	17,1
<i>12</i>	<i>Taxa crescimento</i>	1,00	4,54	9,08	10,3
<i>13</i>	<i>Incremento Ativ Enz.</i>	1,00	3,84	4,03	5,53

Nota: Os valores de frutooligossacarídeos totais (T FOS) foram obtidos pela soma de GF₂, GF₃ e GF₄. O rendimento foi calculado através do cálculo: $([\text{Total FOS}]/[\text{Sac}_{\text{in}}]) \cdot 100$. Os valores de taxa de crescimento (12) e incremento de atividade enzimática (13) foram calculados pelo valor obtido no tempo de amostragem dividido pelo valor inicial às 0h de processo.

Os dados apontam um incremento na atividade enzimática e na biomassa microbiana durante o processo demonstrando a manutenção da viabilidade celular e a atividade enzimática durante o período. O gráfico 1 a seguir esboça essa correlação de dados.

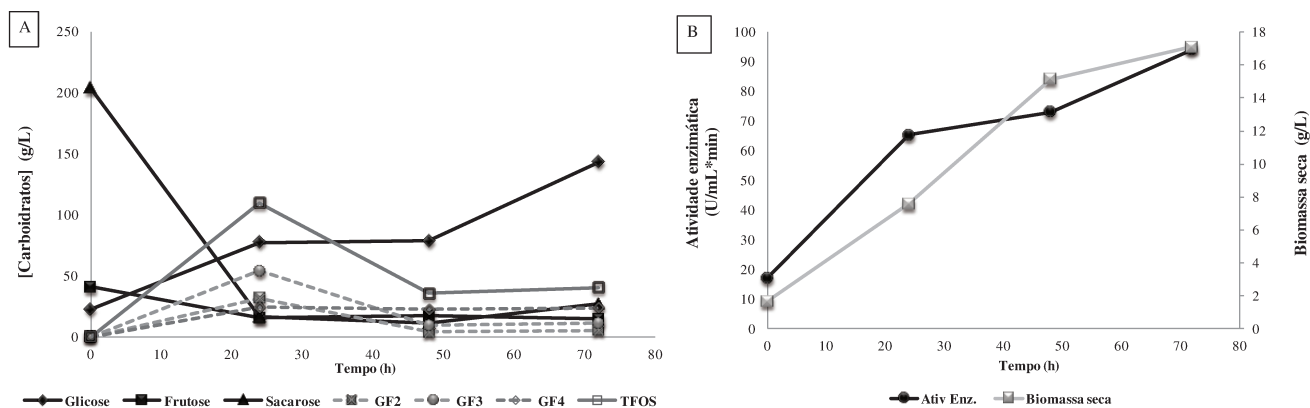


Figura 1: Gráficos A: conversão da sacarose em FOS; B: atividade enzimática e biomassa microbiana, durante a biotransformação da sacarose pelo *Aureobasidium pullulans*, utilizando xarope de cana-de-açúcar como substrato alternativo

A produção de FOS utilizando xarope de cana-de-açúcar como substrato alternativo à sacarose apresentou uma ótima bioconversão da sacarose em FOS às 24 horas de processo, com rendimento de 54% de rendimento. Entretanto, o valor total de FOS produzidos foi de 110 g/L, devido a baixa concentração de sacarose inicial no xarope de 203 g/L.

Shin *et al.* (2004) realizou um estudo de produção de FOS utilizando melão como substrato alternativo como fonte de sacarose contendo 360 g/L de sacarose inicial no meio. Após 24 horas de cultura com células de *A. pullulans*, ele obteve valores de 166 g/L de FOS totais apresentando 46% de rendimento em relação ao teor de sacarose inicial.

Oliveira *et al.* (2007) avaliou a produção de levana, um polissacarídeos de frutose unidos por ligações do tipo β -2,6, em diferentes substratos como fontes alternativas de sacarose, como o melão e o xarope de cana-de-açúcar. Todos os substratos foram padronizados em 250 g/L de sacarose. As concentrações de levana produzida foram de 21,7 g/L em sacarose comercial, 15,5 g/L em xarope e 2,5

g/L em melaço. Entretanto a produção de biomassa, quando o micro-organismo foi cultivado em xarope foi muito maior quando cultivado em meio sintético.

Assim como o estudo acima, os resultados obtidos de crescimento do *Aureobasidium pullulans* durante o cultivo em xarope demonstrou uma taxa de crescimento de 17,1. Quando comparados em estudos anteriores (capítulo 4), em que o micro-organismo foi cultivado em meio de sacarose, nas condições de validação do modelo, contendo 440 g/L de sacarose inicial, a taxa de crescimento foi de 9,3.

3.2. Síntese de FOS em biorreator de bancada

Antes de se iniciar o processo contínuo, foi realizada a reação em batelada, nas mesmas condições realizadas no experimento de validação de modelo, com o intuito de se atingir a biomassa mínima para iniciar o processo contínuo. Sendo assim, a reação em batelada iniciou-se com 450 g/L de sacarose inicial e 18% de inóculo. Os resultados estão apresentados na tabela 2 e gráfico 2.

Tabela 2. Parâmetros de produção de FOS avaliados durante a bioconversão da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium pullulans* conduzida em biorreator.

	<i>Biorreator sistema batelada</i>					<i>Biorreator sistema contínuo</i>				
	<i>Tempo (h)</i>					<i>Tempo (h)</i>				
<i>Parâmetros</i>	<i>0</i>	<i>16</i>	<i>24</i>	<i>43</i>	<i>48</i>	<i>65,5</i>	<i>72</i>	<i>91</i>	<i>98</i>	<i>120</i>
<i>Glicose (g/L)</i>	0,00	129	155	149	149	112	116	119	110	94,2
<i>Frutose (g/L)</i>	0,00	13,2	13,9	13,0	13,0	9,9	8,9	8,0	7,5	7,4
<i>Sacarose (g/L)</i>	450	89,9	64,8	48,6	48,6	127	100	69,5	84,9	148
<i>GF2 (g/L)</i>	0,00	158	167	175	138	125	122	125	130	124
<i>GF3 (g/L)</i>	0,00	132	135	158	175	94,0	82,6	86,0	77,6	58,5
<i>GF4 (g/L)</i>	0,00	16,0	13,7	28,8	34,0	26,8	25,1	26,5	23,0	17,4
<i>TFOS (g/L)</i>	0,00	306	315	362	347	246	229	237	230,1	200
<i>Rendimento</i>	0	67,9	70,1	80,5	77,2	54,7	51,0	52,8	51,1	44,4
<i>Produtividade (g/L.h)</i>	0,00	18,5	13,1	8,42	7,39	9,8	9,2	9,5	9,2	8,0
<i>Biomassa seca (g/L)</i>	0,759	1,34	1,55	1,65	1,65	0,796	0,518	0,267	0,150	0,106
<i>Taxa crescimento</i>	1	1,76	2,04	2,18	2,18	1,05	0,683	0,351	0,198	0,140
<i>Ativ Enz. (U/mL.min)</i>	26,0	35,1	40,2	68,7	58,9	28,9	17,7	17,6	17,5	5,75
<i>Incremento Ativ Enz.</i>	1	1,4	1,5	2,6	2,3	1,1	0,68	0,68	0,67	0,22

Nota: Valores de produtividade foram calculados na etapa de processo em batelada: (TFOS)/tempo e na etapa contínua: (TFOS)*D. D=0,04/h. Taxa de crescimento e incremento de atividade enzimática foram calculados a partir dos valores nos determinados tempos de amostragem dividido pelos valor inicial as 0 horas.

Durante as primeiras 48 horas, na qual o sistema operava em batelada, o perfil de produtividade e conversão de frutooligosacarídeos ocorreu como o esperado, primeiramente convertendo sacarose em GF₂, atingindo maiores valores de GF₃ e GF₄ às 48 horas. A produtividade máxima de FOS totais foi de 18,5 g/L.h as 16 horas, com valor de 306 g/L de FOS totais, dentre eles 51,6% de kestose (GF₂). A maior concentração de FOS foi atingida às 43 horas de processo com 362 g/L, conforme representados pela Figura 2.

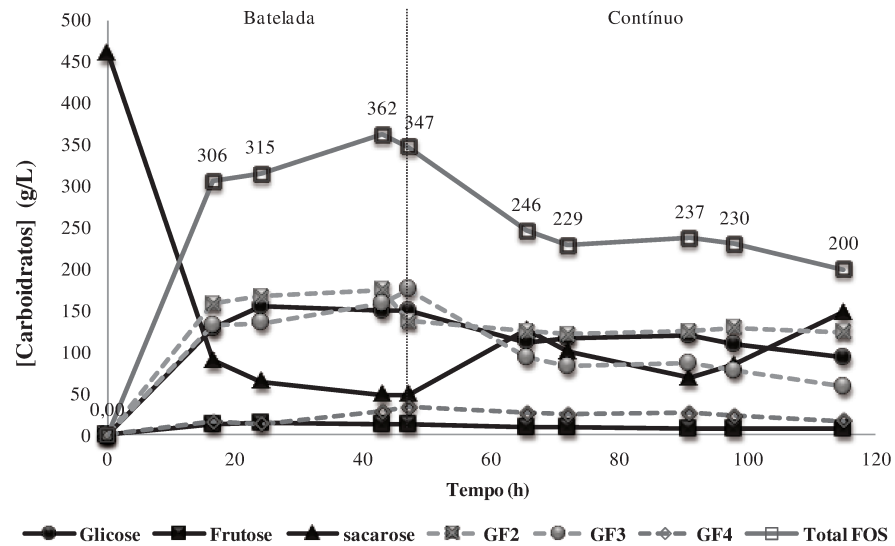


Figura 2: Gráfico de síntese de FOS e consumo de sacarose durante a bioconversão da sacarose em FOS pelo *Aureobasidium pullulans* conduzida em biorreator em sistema de batelada e contínuo.

Os parâmetros avaliados durante a biotransformação da sacarose no biorreator, comparados aos parâmetros de estudos anteriores, em que o processo foi otimizado em frascos Erlenmeyers, a taxa de crescimento apresentou-se muito abaixo, com valor de 2,2 em comparação com 7 obtida no experimento de validação de modelo (capítulo 4 desta tese). Este fato pode ser explicado pelo volume maior do processo e por ajustes de fatores como agitação e aeração não terem sido suficientes para manter a mesma velocidade de crescimento encontrada nos experimentos de menor volume. A figura 3 apresenta os resultados de biomassa seca e da atividade enzimática total, durante as 120 horas de processo que incluem a etapa de batelada e produção contínua.

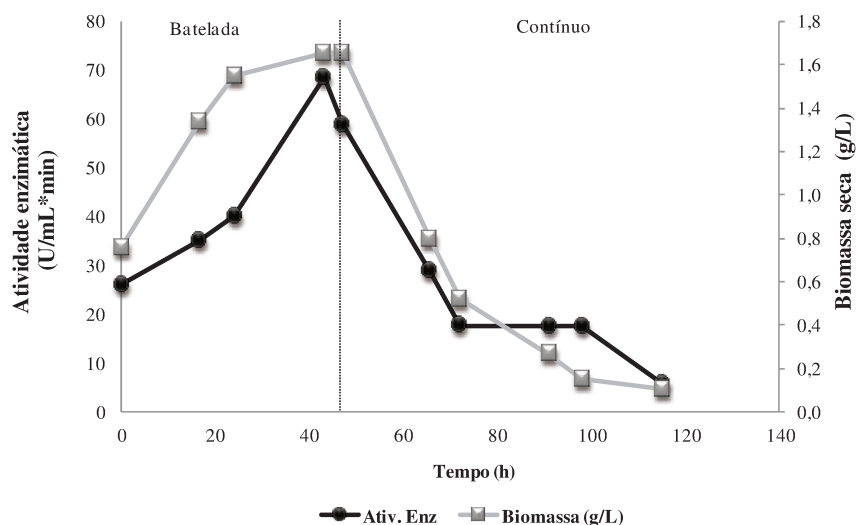


Figura 3: Atividade enzimática e biomassa seca profiles during 120 horas de processo de biotransformação da sacarose pelo *Aureobasidium sp.* em biorreator que incluem a etapa de batelada, de 0 a 48 horas e etapa de produção contínua das 48 as 120 horas o processo no bioerreator.

Tanto a biomassa quanto a atividade enzimática apresentaram baixos valores durante o processo em batelada e um decréscimo notório após iniciar o sistema contínuo. De acordo com conceitos de processos contínuos, para que a taxa de crescimento microbiana permaneça constante, a taxa de diluição deve ser no mínimo igual ao valor de velocidade de crescimento do micro-organismo (μ) (MADIGAN, *et al.*, 2011). Diante disso, a taxa de diluição (D) utilizada no processo contínuo de 0,04/h mostrou ser muito maior que a velocidade específica máxima (μ máximo) do micro-organismo.

Com os dados obtidos de densidade óptica para avaliação do crescimento na etapa de batelada alimentada, no meio contendo 450 g/L de sacarose e condições de incubação de 30°C, 150 rpm de agitação e 1 vvm de aerção, foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento (μ) de 0,02/h., conforme os dados apresentados na Tabela 3 e Figura 4.

Tabela 3: Valores de densidade óptica e logaritmo neperiano (Log N) obtidos durante o cultivo do *Aureobasidium pullulans*. em biorreator durante o período de batelada.

<i>Tempo (h)</i>	<i>D.O (600 nm)</i>	<i>Log N</i>
0	0,33145	-1,104
16,5	0,5136	-0,666
24	0,54175	-0,613
43	0,6987	-0,359
47	0,645	-0,439

$\mu_{\text{máx}} = 0,0215$

Nota: A taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada segundo o coeficiente angular da equação da reta do logaritmo neperiano da densidade óptica em função do tempo.

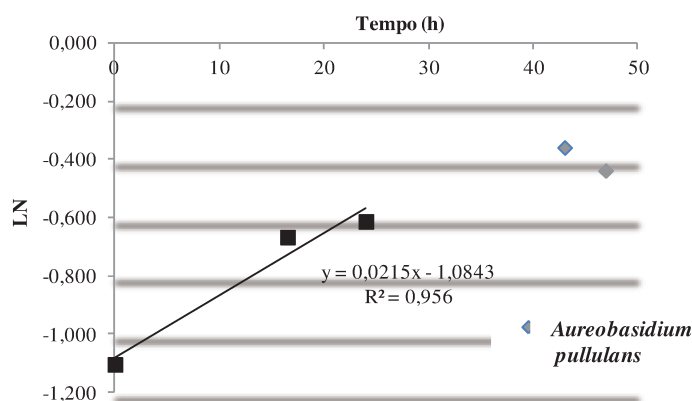


Figura 4: Cálculo da velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de crescimento determinada segundo o coeficiente angular da equação da reta do logaritmo neperiano da densidade óptica em função do tempo durante o cultivo do *Aureobasidium pullulans* em biorreator em modo batelada.

Apesar da taxa de diluição não ter sido adequada para o sistema contínuo, a produtividade de FOS apresentou-se constante nesta etapa, com valores em média de 9,1 g/L.h até as 72 horas de processamento e uma concentração de FOS totais média de 228 g/L.

Estes valores ainda demonstram uma eficiência do processo, provavelmente devida à presença de enzimas liberadas durante a fase de reação em batelada, a qual pode estar ativa tanto intra como extracelularmente, de acordo com Shin *et al.* (2004).

Sheu *et al.* (2002) trabalhou com sistema contínuo culturas mistas de micro-organismos como *A. pullulans* e *G. oydans* apresentou uma produção de frutooligosacarídeos totais 165 g/L em média representando uma produtividade de 6,62 g/L.h no processo, utilizando D de 0,04.h⁻¹.

Sanchez *et al.* 2008, utilizando um biorreator airlift de membrana para a síntese de FOS a partir de *Aspergillus sp.* N74 e concluiu a reação específica de transfrutossilacção e o total de frutooligosacarídeos produzidos foram dependentes da concentração da biomassa durante o cultivo.

4. CONCLUSÕES

A utilização do xarope de cana-de-açúcar como substrato alternativo para bioconversão de sacarose em frutooligosacarídeos apresentou ótimo desempenho com uma taxa de conversão de sacarose em FOS de 54 % após 24 horas de processo, mostrando ser uma fonte atraente para substituir a sacarose de alta pureza neste processamento. A desvantagem foi a baixa concentração inicial de sacarose nesse meio que foi determinante no teor de frutooligosacarídeos totais formados.

O processo de biotransformação da sacarose em biorreator mostrou-se ser efetivo uma vez que atingiu valores médios de produtividade de 9 g/L.h e concentração de frutooligosacarídeos totais em torno de 228 g/L mesmo não estando nas condições ideais para manter a taxa de crescimento microbiana que em consequência ocorreu um decréscimo da concentração e atividade da enzima no meio, levando a uma concentração de sacarose relativamente alta e perda de produtividade durante o processo contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, H.Q. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Apergillus ficum* JNSP5-06 using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v,86, p. 249-254, 2011.

FIALHO, M. B. *et al.* Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. **Mycoscience**, v. 54, p.198-205, 2013.

KATAPODIS, P., *et al.* Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.378–382, 2004.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed.: Benjamin Cummings, 2011. 1043 p.

OLIVEIRA, A.J. *et al.* **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: Fermentec-Fealq-Esalq, 1996. 89 p.

OLIVEIRA *et al.* Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.177-183, 2007.

SANCHEZ, O. *et al.* Fructooligosaccharides production by *Aspergillus sp.* N74 in a mechanically agitated airlift reactor. **Food And Bioproducts Processing**, 86, p.109-115, 2008.

SHEU, D.C. *et al.* Continuous Production of High-Content Fructooligosaccharides by a Complex Cell System. **Biotechnology Progress**, v. 18, p.1282-1286, 2002.

SHIN, H.T. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, n. , p.52-62, 2004.

YUN, Jong Won. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 19, p.107-117, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

O processo de biotransformação da sacarose utilizando micro-organismos osmofílicos se mostrou altamente eficiente, apresentando alta atividade de transfrutossilação, ao mesmo tempo que os micro-organismos mostraram-se capazes em se desenvolver nos meios contendo altas concentração osmótica, com concentrações de 400 a 600 g/L de sacaros.

O *Bacillus sp.* produziu uma mistura de frutooligossacarídeos, contendo tanto moléculas de cadeia curta, como o GF₂, GF₃ e GF₄, quanto moléculas de cadeia longa como, GF₅ a GF₁₁, conforme análise por espectrometria de massas, durante o processo de biotransformação da sacarose utilizando células livres. Dentro desta avaliação os parâmetros extrato de levedura e sulfato de amônia exerceram efeitos positivos e pH, agitação e sulfato de zinco exerceram efeitos negativos para a síntese de frutooligossacarídeos.

O processo de biotransformação da sacarose utilizando o micro-organismo *Aureobasidium pullulans* iniciou-se com o estudo de 12 parâmetros, e ao final da pesquisa, o processo foi simplificado à 2 parâmetros significativos e o cultivo microbiano foi definido utilizando-se um resíduo agroindustrial, que é o melaço de usina de açúcar.

O micro-organismo *Aureobasidium pullulans* apresentou ótimos valores de rendimento e produtividade para a síntese de frutooligossacarídeos totais e os estudos de otimização de processos alcançaram pontos máximos de produção tanto para frutooligossacarídeos totais, quanto para a síntese dos oligossacarídeos intermediários GF₂, GF₃ e GF₄. Nas condições otimizadas, foi possível atingir valores de máxima produção de GF₂ em 205 g/L às 24 horas, GF₃ em 187 g/L às 48 horas e GF₄ em

72 g/L às 72 horas. Este foi o primeiro estudo capaz de definir modelos e alcançar valores ótimos de processo também para os produtos intermediários da reação.

Por meio dos estudos de otimização foi possível incrementar a produção de frutooligossacarídeos totais, que inicialmente era de 288 e 251,5 g/L de FOS totais e rendimentos de 72% e 63% em 24 e 48 horas de incubação respectivamente, com uma produtividade de 10,3 g/L.h às 24 horas, passando à 351 e 374 g/L de FOS totais e rendimentos de 53,5% e 57% em 24 e 48 horas respectivamente, atingindo uma produtividade de 14,7 g/L.h às 24 horas de incubação.

A utilização do xarope de cana-de-açúcar (caldo concentrado) se mostrou um ótimo substituto à sacarose como substrato para as reações de transfrutossilacção, atingindo valores de 54% de rendimento, apresentando vantagens de ser um substrato de baixo custo, quando comparado à sacarose de alto grau de pureza.

O processo realizado em sistema contínuo utilizando a biotransformação com células íntegras de *Aureobasidium pullulans* se mostrou promissor para a aplicação industrial, uma vez que o produto é obtido diretamente no processo eliminando as etapas de produção e purificação da enzima. A produção manteve-se durante todo o período em torno de 228 g/L e uma produtividade média de 9 g/L.h.

Como sugestão para trabalhos futuros, visando aperfeiçoar e dar continuidade a esta pesquisa, seria interessante investigar a otimização do processo contínuo utilizando taxas de diluições comparadas às velocidades de crescimento do micro-organismo. Além disso, poderiam ser estudadas a aplicação do xarope de cana para a bioconversão da sacarose em FOS pelo processo contínuo, uma vez que são substratos abundantes provenientes da indústria açucareira no Brasil.

Outro estudo a ser realizado seria a continuidade dos planejamentos de otimização do processo de biotransformação de sacarose, pelo *Bacillus sp.*