

Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por aprisionamento em alginato e ágar-ágar
Immobilization of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* by entrapment in alginate and agar-agar

Resumo:

Fruto-oligosacarídeos são oligômeros de frutose com baixo valor calórico e propriedades funcionais, cuja síntese ocorre através da ação de enzimas, preferencialmente as frutossiltransferases. Todavia, o uso de enzimas em sua forma nativa é prejudicado pela dificuldade de recuperação e reutilização. Para minimizar esses problemas utilizam-se as técnicas de imobilização de enzimas. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* em alginato e ágar-ágar. Em alginato os melhores resultados foram 22,24 e 19,99%, para as atividades hidrolítica e de transfrutossilção, respectivamente. Com relação à imobilização em ágar-ágar o melhor resultado para a atividade hidrolítica foi 42,65%, observado em 5,0% do suporte, e para atividade de transfrutossilção 13,23% obtido em 3,0%. A frutossiltransferase imobilizada em ágar-ágar apresentou maior retenção da atividade hidrolítica, indicando a possibilidade de aplicações do biocatalisador imobilizado em processos contínuos de hidrólise de sacarose na indústria de alimentos.

Abstract:

Fructooligosaccharides are fructose oligomers with low caloric values and functional properties, whose synthesis for industrial application occurs through the action of enzymes, preferably the fructosyltransferases. However, the use of enzymes in their native form is hampered by the difficulty of recovery and reuse of the enzyme. To minimize these problems, enzyme immobilization techniques are used. Therefore, the present work aims to evaluate the immobilization of the fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* in alginate and agar-agar. For immobilization in alginate the best results were 22.24 and 19.99%, for hydrolytic and transfructosylation activities, respectively. In relation to immobilization in agar-agar, the best result for the hydrolytic activity was 42.65%, observed in 5.0% of the support, and for the transfructosylation activity 13.23% obtained in 3.0%. The immobilized fructosyltransferase in agar-agar showed a higher retention of hydrolytic activity, indicating the possibility of immobilized biocatalyst applications in continuous processes of sucrose hydrolysis in the food industry.



**Rodrigo Lira de Oliveira¹,
Marcos Fellipe da Silva, Tatiana
Souza Porto**

¹Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO),
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).
E-mail: rodrigolira1@outlook.com

Contato principal
Rodrigo Lira de Oliveira¹



Palavras chave: Frutossiltransferase; *Aspergillus aculeatus*; Imobilização de enzimas.

Keywords: Fructosyltransferase; *Aspergillus aculeatus*; Enzyme immobilization



INTRODUÇÃO

A sociedade contemporânea tem apresentado um crescente interesse com relação a melhoria da saúde e boa alimentação, em consequência disto nutracêuticos e alimentos funcionais têm obtido uma atenção especial no desenvolvimento de novos produtos alimentares durante as últimas décadas (BALI et al., 2013). O conceito de alimentos funcionais está relacionado a um alimento ou ingrediente com efeitos positivos na saúde e/ou bem-estar do consumidor além de seu valor nutritivo. Nos últimos anos, esse conceito tornou-se mais direcionado aos aditivos alimentares que podem exercer um efeito positivo sobre a composição intestinal, principalmente probióticos e prebióticos (HERNALSTEENS; MAUGERI, 2008). Entre os prebióticos, os fruto-oligossacarídeos (FOS) tem recebido um interesse particular devido a suas excelentes propriedades biológicas e funcionais.

Os FOS são oligômeros de frutose compostos principalmente por 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), nos quais as unidades de frutossil (F) estão ligadas na posição β (2 \rightarrow 1) da molécula de sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996). Estes compostos são amplamente utilizados como adoçantes artificiais e são considerados como fibras dietéticas com baixo valor calórico que promovem o crescimento de bifidobactérias no cólon humano. Além disso os FOS apresentam outros benefícios importantes para saúde humana tais como estímulo a absorção de cálcio e magnésio, não são cariogênicos, seguros para diabéticos, possui efeito preventivo do câncer de cólon e diminuição dos níveis de colesterol total (DOMINGUEZ et al., 2013; GANAIE et al., 2014).

A produção de FOS em escala industrial ocorre por ação de duas classes de enzimas: fructossiltransferases (FTase; E.C. 2.4.1.9) e β -fructofuranosidasas (FFase; E.C. 3.2.1.26), também denominadas como invertases. As FTases possuem maior atividade de transfrutossililação do que FFases e são preferencialmente empregadas. Ambas as enzimas podem ser obtidas a partir de diferentes fontes vegetais e microbianas, sendo os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* os responsáveis pelas maiores produções a nível industrial (DETOFOL et al., 2015).

O uso de enzimas solúveis em aplicações industriais, como a síntese de FOS, é muitas vezes dificultado pela falta de estabilidade operacional a longo prazo e dificuldades de recuperação e reutilização da enzima. Estas desvantagens geralmente podem ser superadas através das técnicas de imobilização de enzimas, que consistem basicamente no confinamento das enzimas em uma determinada região do espaço com retenção de suas propriedades catalíticas possibilitando seu reuso e utilização em processos contínuos (SHELDON; VAN PELT, 2013). Vários métodos podem ser empregados para a imobilização de enzimas tais como adsorção, aprisionamento (entrapment), ligação covalente e ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas de enzima (EDET; NTEKPE; OMEREJI, 2013). O aprisionamento é

uma técnica baseada na oclusão de enzimas em uma rede polimérica sintética ou natural, que forma uma membrana permeável que permite que os substratos e os produtos passem por ele, mas mantém a enzima dentro da rede (NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

Polissacarídeos extraídos de algas como alginato e ágar-ágar são frequentemente empregados para imobilizar enzimas via aprisionamento. Alginato é um copolímero de ocorrência natural que consiste em ácido manurônico e ácido gulurônico, na presença de cátions bivalentes forma géis estáveis. Sua aplicação é justificada pela sua biocompatibilidade, baixo custo, disponibilidade, resistência à contaminação microbiana e altas taxas de difusão de macromoléculas (KUMAR et al., 2006; REHMAN et al., 2013). Já o ágar-ágar é um polímero inerte possuindo duas unidades principais: agarose e agarpectina, seu gel pode atuar como uma barreira para a enzima com suporte contra várias condições industriais, incluindo cisalhamento mecânico, efeito solvente e alta temperatura (NAWAZ et al., 2015). Diante do exposto o presente estudo tem como objetivo avaliar diferentes matrizes, alginato e ágar-ágar, na imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus*, investigando as variáveis que influenciam seus respectivos processos de imobilização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e local de execução dos experimentos

Foi utilizada a preparação enzimática comercial Pectinex Ultra SP (P2611 Sigma) obtida a partir de *A. aculeatus* com comprovada atividade de transfrutossililação como reportado por Vega-Paulino e Zúñiga-Hansen (2012). Sacarose, alginato, ágar-ágar e todos os reagentes utilizados no presente estudo foram de grau analítico. Todos os experimentos foram realizados na Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG) pertencente à Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Atividade de frutossiltransferase

A atividade de FTase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2004) com algumas modificações, como se segue: 0,25 mL da FTase foi misturada com 0,75 mL de sacarose (60% p/v dissolvida em tampão acetato, 0,1 M, pH 5,0), a mistura da reação foi incubada por 1 h a 55°C. Após a reação, amostras foram coletadas para quantificação de glicose e açúcares redutores totais. A concentração de glicose (G) nas amostras foi determinada utilizando o kit de glicose oxidase (Labtest Diagnóstica S.A.) e a de açúcares redutores totais (RS) através do método do ácido 3'5 dinitrosalicílico (DNSA) proposto por Miller (1959). Uma unidade de atividade hidrolítica (UH) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de sacarose por minuto. Uma unidade de atividade

de transfrutossilatação (UTF) é definida como sendo a quantidade de enzima necessária para transferir 1 µmol de frutose por minuto. A frutose livre (F) e transferida (F') no meio reacional foi estimada pelas Equações 1 e 2, conforme reportado por Chen e Liu (1996).

$$F = RS - G \quad (1)$$

$$F' = G - F = 2G - RS \quad (2)$$

Imobilização da frutossiltransferase em alginato

A imobilização da FTase em alginato foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bickerstaff (1997) com modificações. A enzima e a solução de alginato foram misturadas (1:4) e o complexo foi adicionado por gotejamento em uma solução de CaCl₂ para formação das esferas de alginato de cálcio. As enzimas imobilizadas foram mantidas em solução de CaCl₂ por 20 minutos afim de conferir maior resistência aos agregados imobilizados. Finalmente, os agregados foram lavados com tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) para remoção das enzimas não aprisionadas no suporte. Os experimentos para imobilização da FTase foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo 2² com três pontos centrais, cujas variáveis analisadas foram as concentrações de alginato de sódio e cloreto de cálcio, os níveis utilizados no planejamento experimental encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial (2²) usado para avaliar a imobilização da FTase de *Aspergillus aculeatus* em alginato.

Variáveis	Níveis		
	-1,0	0	+1,0
Alginato de sódio (% p/v)	3,5	4,0	4,5
CaCl ₂ (M)	0,2	0,4	0,6

Tabela 2. Condições experimentais e resultados obtidos para a imobilização da FTase de *Aspergillus aculeatus* por aprisionamento em alginato realizado de acordo com planejamento fatorial 2².

Ensaio	Alginato de sódio (% p/v)	CaCl ₂ (M)	Y _H ¹ (%)	Y _{TF} ² (%)
1	3,5	0,2	10,51	2,43
2	4,5	0,2	22,91	9,42
3	3,5	0,6	18,51	17,86
4	4,5	0,6	22,24	19,99
5 (C)	4,0	0,4	17,22	12,66
6 (C)	4,0	0,4	18,96	14,85
7 (C)	4,0	0,4	19,94	16,73

¹Rendimento de imobilização para atividade hidrolítica.

²Rendimento de imobilização para atividade de transfrutossilatação.

Os melhores rendimentos foram obtidos no Ensaio 4 (Alginato de sódio: 4,5 %; CaCl₂: 0,6 M) e foram de 22,24 e 19,99% para as atividades hidrolítica e de transfrutossilatação, respectivamente. Estes resultados são ligeiramente baixos, no entanto são de grande valor pois fornecem o fundamento para estudos de otimização para a

A variável resposta utilizada no planejamento foi o rendimento de imobilização (Y) que foi calculado utilizando a Equação 3.

$$Y (\%) = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{Atividade da enzima livre}} \times 100 \quad (3)$$

A análise estatística dos resultados do planejamento experimental foi realizada através do software Statistica 6.0.

Imobilização da frutossiltransferase em alginato

A imobilização da FTase em ágar-ágar foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Nawaz et al. (2015). Foram preparadas soluções de ágar em diferentes concentrações (1,0–5,0%) em tampão acetato (0,1 M; pH 5,0) sob aquecimento a aproximadamente 60°C, em seguida foram submetidas a resfriamento até 45°C. Ao chegar a esta temperatura foi adicionada a solução de FTase na mesma proporção, em seguida a mistura ágar-FTase foi imediatamente transferida para placas de Petri e mantidas sob temperatura de refrigeração até completa solidificação. Após a solidificação o gel de ágar foi cortado em formado de discos com diâmetro de 5 mm e posteriormente lavados no mesmo para remoção de enzimas não aprisionadas no suporte. O rendimento de imobilização (Y) foi calculado utilizando a Equação 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preparação comercial obtida de *A. aculeatus* apresentou atividade hidrolítica e de transfrutossilatação de 377,96 e 301,69 µmol/mL/min, respectivamente. Ao avaliar a imobilização da FTase em alginato é necessário avaliar os parâmetros que influenciam o processo de gelificação, para isso foi utilizado um planejamento fatorial 2² cujas condições utilizadas e resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 2.

imobilização neste suporte. Os efeitos estatísticos para as variáveis resposta utilizadas encontram-se dispostos na Tabela 3.

Observou-se que com relação ao rendimento de imobilização para a atividade hidrolítica a única variável significativa foi a concentração de alginato de sódio,

sendo um efeito positivo, indicando que maiores concentrações desse polissacarídeo irão proporcionar maiores rendimentos. Sabe-se que maiores concentrações de alginato de sódio acarretarão em diminuição dos poros da matriz polimérica podendo ocasionar maior retenção da enzima devido ao tamanho da molécula ou limitação da difusão do substrato para atingir o sítio ativo da enzima, resultando em diminuição dos rendimentos (REHMAN et al., 2013).

Tabela 1. Efeitos calculados para as variáveis respostas do planejamento fatorial completo 2^2 para imobilização da FTase de *Aspergillus aculeatus* em alginato.

Variável ou interação	\bar{Y}_H (%)	\bar{Y}_{TF} (%)
(1) Alginato de sódio	5,86*	2,23
(2) CaCl ₂	2,66	6,37*
1 x 2	-3,15	-1,18

*Estatisticamente significativo a um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos no presente estudo provavelmente se enquadram no primeiro caso, e na faixa de concentrações utilizadas obtiveram-se resultados semelhantes aos obtidos por Anwar et al. (2009) na imobilização de protease de *Bacillus subtilis* no mesmo suporte. Já com relação ao rendimento de imobilização para atividade de transfrutossilatação observou-se que a concentração de CaCl₂ foi a única variável significativa, sendo também um efeito positivo. Em geral, altas concentrações de CaCl₂ podem causar diminuições nos rendimentos de imobilização devido a alterações no pH devido a concentração de CaCl₂ (REHMAN et al., 2013), no entanto nas concentrações avaliadas não foi observado esse comportamento.

A imobilização de enzimas em ágar-ágar é diretamente relacionada com a porosidade da matriz, que por sua vez é dependente da concentração desse suporte (REHMAN et al., 2014). Em virtude disso, no presente estudo foram avaliadas concentrações de 1,0 a 5,0%, não sendo possível avaliar concentrações superiores, uma vez que o gel solidificava antes da adição da enzima. A influência de diferentes concentrações de ágar-ágar no rendimento de imobilização da FTase pode ser visualizada na Figura 1.

Com relação à atividade hidrolítica observou-se um aumento do rendimento de imobilização proporcional a concentração de ágar-ágar, sendo a maior retenção de atividade de 42,65 %, obtida na concentração de 5%. Prakash e Jaiswal (2011) ao estudarem a imobilização de α -amilase extraída de soja obtiveram melhores rendimentos em 4% de ágar-ágar. Ao considerar a atividade de transfrutossilatação, o melhor resultado obtido foi 13,23% em uma concentração de 3,0% de ágar-ágar. Para ambas atividades foram observados melhores resultados em concentrações ligeiramente altas do suporte, isso porque baixas concentrações de ágar tendem a formar um gel muito frágil com poros maiores que favorecem a perda de enzima por lixiviação resultando em baixos rendimentos (BIBI et al., 2015). Os resultados obtidos para a imobilização da FTase em ágar-ágar indicam que

este suporte foi mais eficiente na retenção da atividade hidrolítica da enzima em relação a de transfrutossilatação, possibilitando possíveis aplicações na hidrólise de sacarose para produção de açúcar invertido, que é largamente utilizado na preparação de geleias, doces e chocolates.

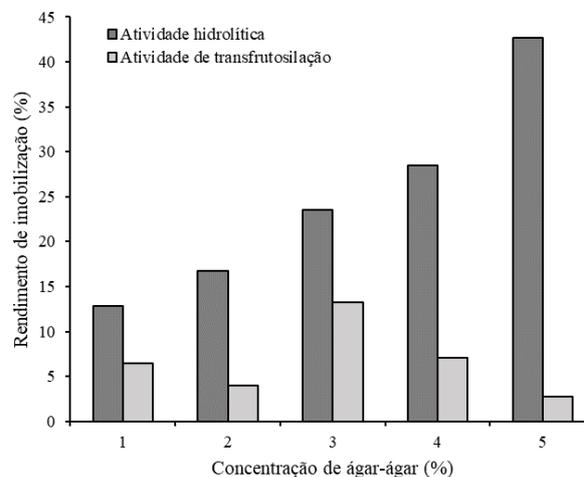


Figura 1. Influência de diferentes concentrações de ágar-ágar na imobilização de FTase de *Aspergillus aculeatus*.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para a imobilização da frutossiltransferase de *A. aculeatus* em alginato foram ligeiramente baixos, no entanto provêm um indicativo do comportamento da enzima com o suporte que pode ser utilizado para posteriores estudos de otimização. Com relação a imobilização em ágar-ágar observou-se que houve uma maior retenção da atividade hidrolítica da enzima (42,65%) indicando a possibilidade de aplicações do biocatalisador imobilizado em processos contínuos de hidrólise de sacarose para produção de açúcar invertido.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAR, A.; QADER, S. A. U.; RAIZ, A.; IQBAL, A.; AZHAR A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281–1286, 2009.

- BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B.; PANESAR, R. Fructo-oligosaccharides: Production, purification and potential applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 8398, n. June 2014, p. 37–41, 2013.
- BIBI, Z.; SHAHID, F.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Agar-agar entrapment increases the stability of endo- β -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 121–127, 2015.
- BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 1997.
- CHEN, W. C.; LIU, C. H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 2, p. 153–160, 1996.
- DETOFOL, M. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; SOARES, A. B. J.; SOARES, M. B. A.; MAUGERI, F. Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 44–51, 2015.
- DOMINGUEZ, A. L.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, N. M.; TEIXEIRA, J. A. An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1–14, 2013.
- EDET, E.; NTEKPE, M.; OMEREJI, S. Current Trend in Enzyme Immobilization: A Review. **International Journal of Modern Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 31–49, 2013.
- GANAIE, M. A.; RAWAT, H. K.; WANI, O. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 840–844, maio 2014.
- HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Purification and characterisation of a fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 589–596, 2008.
- KUMAR, R. S. S.; VISHWANATH, K. S.; SINGH, S. A.; RAO, A. G. A. Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2282–2288, nov. 2006.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; AMAN, A.; MARCHETTI, R.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A. Continuous degradation of maltose: Improvement in stability and catalytic properties of maltase (α -glucosidase) through immobilization using agar-agar gel as a support. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 4, p. 631–638, 2015.
- NISHA, S.; KARTHICK, A.; GOBI, N. A Review on Methods , Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.
- PRAKASH, O.; JAISWAL, N. Immobilization of a thermostable α -amylase on agarose and agar matrices and its application in starch stain removal. **World Applied Sciences Journal**, v. 13, n. 3, p. 572–577, 2011.
- REHMAN, H. U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1081–6, 15 ago. 2013.
- REHMAN, H. U.; AMAN, A.; ZOHRA, R. R.; QADER, S. A. U. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 622–626, 2014.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 530–537, 2004.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.
- 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.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996.