



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUIMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA CRISTIANE RABELO

**SÍNTESE ENZIMÁTICA E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ISOMALTO-
OLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA**

FORTALEZA

2012

MARIA CRISTIANE RABELO

**SÍNTESE ENZIMÁTICA E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ISOMALTO-
OLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Diana Cristina Silva de Azevedo.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sueli Rodrigues.

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- R114s Rabelo, Maria Cristiane.
 Síntese enzimática e separação cromatográfica de isomalto-oligossacádídeos de cadeia longa /
 Maria Cristiane Rabelo. – 2012
 87 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de
Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Processos químicos e Bioquímicos.
 Orientação: Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.
 Coorientação: Profa. Dra. Sueli Rodrigues.
1. Engenharia Química. 2. Adsorção. I. Título.

MARIA CRISTIANE RABELO

SÍNTESE ENZIMÁTICA E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE
ISOMALTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE CADEIA LONGA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 17/08/2012.

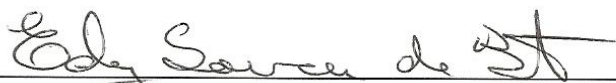
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Diana Cristina Silva de Azevedo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC



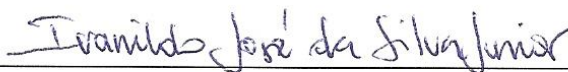
Dr. Eduardo Alberto Borges da Silva
Novozymes Latin America LTDA



Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Universidade Estadual de Campinas - Unicamp



Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico este trabalho aos meus pais Airton e Socorro, pelo amor, apoio, força e incentivo em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades e determinação para finalizar este trabalho.

Aos meus pais, Airton e Socorro, o meu eterno agradecimento pela educação, incentivo, apoio, compreensão, carinho e dedicação ao longo de minha vida.

Aos meus irmãos, Crisóstomo, Crisanto, Júnior e Cláudio, pelo apoio e incentivo constante.

A todos os meus familiares por todocarinho e apoio.

Ao Benjamin, Aurinete e Priscila por todo apoio, carinho e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo, pela generosa acolhida no doutorado em Engenharia Química acreditando no potencial deste trabalho. Agradeço pela disponibilidade, paciência, carinho, atenção e por proporcionar a realização do estágio sanduíche em Portugal e por todo o conhecimento que adquiri com sua orientação.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Sueli Rodrigues, uma grande incentivadora para a realização do Doutorado e contribuiu para o meu crescimento profissional, agradeço pelos valiosos ensinamentos, apoio, paciência, dedicação, confiança, por seu incentivo constante e amizade.

Ao Prof. Dr. Alírio Egídeo Rodrigues, pela orientação no estágio sanduíche realizado no LSRE - Laboratory of Separation and Reaction Engineering da Universidade do Porto onde fui recebida com muito carinho e atenção. Agradeço por sua valiosa contribuição nos experimentos de separação dos isomaltoligossacarídeos e pelos ensinamentos.

Agradeço à Doutora Carla Pereira, membro do LSRE, por todos os ensinamentos durante os experimentos realizados no LSRE, além do carinho, atenção, disponibilidade e apoio.

Agradeço aos membros do LSRE, em especial a Lívia, Mônica, Ana Rita, Pelin, Carine, Inês, Mariana, Paula, Waan, Sandra, Evelin, Patrick e Bruno pela atenção, carinho e amizade.

Aos meus queridos amigos do Labiotec (Laboratório de Biotecnologia – UFC), Imilena, Mariana, Simone, Ana Raquel, Tatiane Maciel, Thatyane Vidal, Niédila, Tatiana Nunes, Ana Lúcia, Diva, Jonas, Rosane, pessoas maravilhosas que me tratam com muito carinho e me apoiam muito.

À Cláudia Fontes, minha eterna gratidão pela colaboração na realização dos experimentos, pela amizade e por todo o apoio.

À Soraya Sancho, pela preciosa amizade, pelo apoio e incentivo e pela valiosa colaboração na elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, que gentilmente aceitou o convite de participar desta banca de defesa de tese, contribuindo significativamente no aprimoramento dos artigos científicos, bem como da tese em geral.

Ao Dr Eduardo Alberto Borges da Silva, prestimosa participação na banca de defesa deste trabalho, contribuindo significativamente no aprimoramento dos artigos científicos, bem como da tese em geral. Agradeço também por todo apoio e pelo conhecimento transmitido nos experimentos de empacotamento de colunas cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Edy Sousa de Brito, pela prestimosa participação nas bancas de qualificação e defesa deste trabalho, contribuindo significativamente com a qualidade deste trabalho.

Ao Dr. Ivanildo José da Silva Jr., pela participação nas bancas de qualificação e defesa, contribuindo significativamente com a qualidade deste trabalho.

Aos funcionários do GPSA, que de alguma forma, sempre estavam dispostos a me ajudar.

Aos colegas quem tive a oportunidade de conviver no decorrer do curso de Doutorado em Engenharia Química.

A todos os professores do Departamento Engenharia Química, pelos ensinamentos e colaboração durante o curso de Doutorado.

Ao PROPAG e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso e pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Os isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos são carboidratos capazes de chegar intactos ao intestino grosso, onde são metabolizados pelas bifidobactérias e lactobacilos ali presentes, estimulando o seu crescimento e proporcionando efeitos benéficos à saúde. Podem ser obtidos por síntese enzimática, entretanto, os substratos não consumidos, frutose e dextrana também estão presentes após a formação dos isomalto-oligossacarídeos. Este trabalho teve por objetivo a síntese enzimática e a separação de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos por cromatografia de troca iônica em escala preparativa. A primeira parte da tese consistiu em investigar o efeito de diferentes estratégias de alimentação de sacarose e maltose ao meio reacional sobre o alongamento da cadeia dos isomalto-oligossacarídeos. A síntese foi realizada adicionando-se 1UI/mL da enzima ao meio reacional contendo como substrato os açúcares sacarose e maltose. Na primeira estratégia, houve a adição somente de sacarose ao meio reacional a cada 2 horas, durante 8 horas. Na segunda estratégia, houve a adição da mistura de sacarose e maltose ao meio reacional a cada 2 horas, durante 8 horas. Na terceira estratégia houve, a cada hora, a adição da mistura de sacarose e maltose, durante seis horas. Após este período, houve adição somente de sacarose durante seis horas. A última estratégia de alimentação, resultou no alongamento da cadeia dos isomalto-oligossacarídeos até grau de polimerização nove, além do aumento da concentração dos mesmos (79,04 g/L) a níveis consideravelmente superiores aos reportados na literatura. Na segunda parte da tese, foi avaliada a influência da forma catiônica de fases estacionárias cromatográficas na separação dos isomalto-oligossacarídeos. As isotermas de adsorção dos isomalto-oligossacarídeos, monossacarídeos e dissacarídeos foram determinados em colunas preparativas empacotadas com resina de troca iônica em diferentes formas catiônicas (K^+ , Ca^{2+} , H^+ e Na^+) à 25°C. Todas as fases adsorveram os açúcares com capacidade variável, segundo a ordem de afinidade: frutose > glicose > maltose > IMOs com grau de polimerização crescente. Foi verificado que a forma catiônica H^+ apresentou melhor desempenho para ser utilizada em unidades de leito móvel simulado permitindo a separação de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos com menor diluição e maior produtividade. No entanto, a resina na forma K^+ apresentou rendimento apenas ligeiramente inferior, sendo mais compatível com os requisitos de tamponamento da reação enzimática.

Palavras-chave: Isomalto-oligossacarídeos. Reação do acceptor. Grau de polimerização. Adsorção.

ABSTRACT

Prebiotic isomalto-oligosaccharides (IMOs) are carbohydrates able to reach the large bowels intact, where they are metabolized by bifidobacteria and lactobacillus, stimulating their growth and providing beneficial health effects. They may be obtained by enzymatic synthesis using sucrose and maltose as precursors. However, non consumed substrates, fructose and dextran are present together with the produced isomalto-oligosaccharides. This work aimed the optimization of the enzymatic synthesis and the separation of prebiotic isomalto-oligosaccharides by ion exchange chromatography on semipreparative scale. The first part of the thesis investigated the effect of different feeding strategies of sucrose and maltose to the reaction medium on the chain elongation of isomalto-oligosaccharides. The synthesis was performed by adding 1UI/mL of enzyme to reaction medium containing sucrose and maltose as substrate. In the first strategy, only sucrose was added to the reaction medium every 2 hours for 8 hours. In the second strategy, a mixture of sucrose and maltose was added to the reaction medium every 2 hours for 8 hours. In the third strategy, at every hour, a mixture of sucrose and maltose was added for six hours. Then, only sucrose was added at every hour for more six hours. The latter strategy resulted of isomalto-oligosaccharides chain elongation up to degree of polymerization of 9. The concentration of IMOs (79.04 g/L) was also observed. In the second part of the thesis, the influence of the cationic form of the chromatographic stationary phase in the isomalto-oligosaccharides separation was evaluated. Adsorption isotherms of isomalto-oligosaccharides, maltose, glucose and fructose were determined in preparative columns packed with ion-exchange resin in different cationic forms (K^+ , Ca^{2+} , H^+ and Na^+) at 25°C. All stationary phases adsorbed the sugars with variable capacities, following the same order of affinity: fructose > glucose > maltose > IMOs with increasing degrees of polymerization. It was found that the resin in H^+ form presented the best performance to be used in simulated moving bed units, allowing for the separation of prebiotic isomalto-oligosaccharides with lower dilution and higher productivity. Nevertheless, the resin K^+ had only a slighty inferior performance and this cation is more compatible with buffer requirements of the enzymatic synthesis.

Keywords: Isomaltooligosaccharides. Acceptor reaction. Polymerization degree. Adsorption.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase na presença de 24
aceptores. EG_i =complexo enzima cadeia crescente de dextrana; A =
acceptor, G = glicose, S = sacarose, F = frutose, AG_{j+i} = produto do
acceptor contendo $j+i$ unidades de glicose (oligossacarídeo resultante da
reação do acceptor).
- Figura 2** - Pico de resposta a um pulso cromatográfico 30
- Figura 3** - Princípio básico do Leito Móvel Verdadeiro 32
- Figura 4** - Unidade de Leito Móvel Simulado. Representação do avanço dos pontos 34
de injeção e retirada das correntes em um tempo de troca t^* .
- Figura 5** - Representação da zona de completa separação obtida pela teoria do 36
Triângulo.

CAPÍTULO 3

- Figure 1** - Thin layer chromatography of the IMOs obtained by enzyme synthesis 51
in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2
containing 1UI / mL of dextransucrase. P represents the pattern
containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the
degree of polymerization of IMOs panose (DP3), maltotetraose (DP4),
maltopentaose (DP5) and maltohexaose (DP6). Lanes 1-4 represent the
assays 1 to 4 (ratio maltose / sucrose 1.125) and lanes 5-8 represent the
assays 5-8 (ratio maltose / sucrose 2.0) (Table 2).
- Figure 2** - Thin layer chromatography of the IMOs (a) and mono-and disaccharides 53
(b) from the synthesis: strategy 1 (Table 1): continued pulse addition of
sucrose (lanes S2H to S8h) and strategy 2 (Table 1): combined addition
of sucrose and maltose (lanes SM2h to SM8h) by pulses. Synthesis was
carried out in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and
pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. P represents the pattern
containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the
degree of polymerization of IMOs.
- Figure 3** - IMOs DP3(□), DP4 (○), DP5 (△) e DP6 (◇) from the synthesis with 54
addition of sucrose (a) and combined addition of sucrose and maltose (b)

by pulses in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase.

Figure 4 - Total IMOs (□) and dextran (○) resulting from the synthesis with continued addition of sucrose (a) and combined addition of sucrose and maltose (b) by pulses in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase enzyme. 55

Figure 5 - Thin layer chromatography of the IMOs (a) and mono- and disaccharides (b) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours (SM1h - SM6h) followed by addition of only sucrose as from seven hours (S7h - S12h) of synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. P represents the pattern containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the degree of polymerization of IMOs. 57

Figure 6 - IMOs DP3(□), DP4 (○), DP5 (△), DP6 (◇) and DP7 (<) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours followed by addition of only sucrose as from seven hours of synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. 58

Figure 7 - Total IMOs (□) and dextran (○) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours followed by addition of only sucrose as from the 7th hour of the synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. 59

Figure 8 - Figure 8. IMOs obtained at the end of synthesis carried out with three different fed strategies of sucrose and maltose to the reaction medium for synthesis of long chain IMOs: addition of only sucrose (■); addition of a mixture containing sucrose and maltose (■) and adding of a mixture containing sucrose and maltose followed by the addition of sucrose alone (□). Synthesis was carried out in stirred batch reactor with thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. 60

CAPÍTULO 4

- Figure 1 -** Adsorption equilibrium isotherms of maltose, fructose, glucose, 72
maltotriose (DP3), maltotetraose (DP4), maltopentaose (DP5),
maltohexaose (DP6) and maltoheptaose (DP7) on ion-exchange resin
Dowex 50WX4 in Ca^{2+} form at 25°C.
- Figure 2 -** Adsorption equilibrium isotherms of maltose, fructose, glucose, 72
maltotriose (DP3), maltotetraose (DP4), maltopentaose (DP5),
maltohexaose (DP6) and maltoheptaose (DP7) on ion-exchange resin
Dowex 50WX4 in K^+ form at 25°C.
- Figure 3 -** Adsorption equilibrium isotherms of maltose, fructose, glucose, 73
maltotriose (DP3), maltotetraose (DP4), maltopentaose (DP5),
maltohexaose (DP6) and maltoheptaose (DP7) on ion-exchange resin
Dowex 50WX4 in Na^+ form at 25°C.
- Figure 4 -** Adsorption equilibrium isotherms of maltose, fructose, glucose, 73
maltotriose (DP3), maltotetraose (DP4), maltopentaose (DP5),
maltohexaose (DP6) and maltoheptaose (DP7) on ion-exchange resin
Dowex 50WX4 in H^+ form at 25°C.
- Figure 5 -** Region of complete separation of a simulated moving bed, according to 77
the equilibrium theory, on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in K^+ ,
 Na^+ and H^+ forms. Parameters γ_2 and γ_3 are fluid-solid velocity ratios in
sections 2 and 3 of an equivalent true moving bed (see equation 9).
Complete separation is defined as the collection of 100% pure prebiotic
isomaltooligosaccharides in the raffinate product and 100% pure mono
and disaccharides in the extract product.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

- Table 1 -** Sucrose and maltose pulse fed strategies for IMO oligosaccharides chain elongation: solely sucrose addition (1), addition of a mixture of sucrose and maltose (2), addition of a mixture of sucrose and maltose followed by solely maltose addition (3) in thermostated batch reactor at 30°C, pH 5.2 containing 1 UI/mL of dextransucrase. 49
- Table 2 -** Substrate concentration and results obtained in IMO synthesis using two different maltose/sucrose ratios: 1.125 (runs 1 to 4) and 2.0 (runs 5 to 8) in a stirred batch reactor (10 mL) at 30°C and pH 5.2. 50

CAPÍTULO 4

- Table 1 -** Summary of bed porosities, phase ratios and number of theoretical plates of the ion-exchange columns in four cationic forms. 71
- Table 2 -** Adsorption constants and selectivity Maltose/maltotriose for resin Dowex 50WX4 at 25°C in the four studied cationic forms. 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CET	Cromatografia de exclusão por Tamanho
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DVB	Divinilbenzeno
FOS	Fruto-oligossacarídeos
IMOS	Isomalto-oligossacarídeos
LMS	Leito Móvel Simulado
LMV	Leito Móvel Verdadeiro
UOP	Universal Oil Products

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Componente mais adsorvido em uma separação binária, adimensional
B	Componente me adsorvido em uma separação binária, adimensional
C	Concentração de equilíbrio do adsorbato na fase fluida, g L ⁻¹
$C(t)$	Concentração do traçador na saída da coluna, g L ⁻¹
HETP	Altura equivalente a um prato teórico, cm
i	Espécie química, adimensional
j	Seção do LMV/LMS, adimensional
K	Constante de Henry, adimensional
L	Comprimento da coluna, cm
N_p	Número de pratos teóricos da coluna, adimensional
pKa	Constante de equilíbrio
Q	Vazão volumétrica de trabalho, mL min ⁻¹
q_0	Concentração de equilíbrio da fase adsorvida, g L ⁻¹
Q^{LMS}	Vazão volumétrica da fase fluida no LMS, mL min ⁻¹
t^*	Tempo de troca, s
T_{ciclo}	Tempo total de um ciclo completo de uma unidade de LMS, s
t_r	Tempo de residência do pico cromatográfico, s
\bar{t}	Espaço de tempo, min
U_{Fj}	Velocidade da fase fluida, m s ⁻¹
U_s	Velocidade da fase sólida, m s ⁻¹
V	Volume da coluna, m ³

Símbolos gregos

α	Seletividade, adimensional
γ_j	Razão entre as velocidades intersticiais do líquido e sólido na seção j adimensional
ε	Porosidade do leito, adimensional
ν	Razão entre as fases sólida/ fluida, adimensional
σ^2	Variância do pico, adimensional

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	17
Capítulo 2 – Revisão da Literatura	20
2.1 Oligossacarídeos pré-bióticos	20
2.2 Isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos	21
2.3 Benefícios dos isomalto-oligossacarídeos	22
2.4 Produção de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos	23
2.5 Métodos de purificação de oligossacarídeos pré-bióticos	25
2.6 Cromatografia de troca iônica	27
2.7 Isotermas de Adsorção	29
2.7.1 Isoterma Linear	30
2.8 Processo cromatográfico contínuo	30
2.9 Leito móvel verdadeiro (LMV)	31
2.10 Leito móvel simulado (LMS)	33
2.11 Teoria do equilíbrio (Método do triângulo)	35
REFERÊNCIAS	37
Capítulo 3 – Enzyme synthesis of long chain isomaltooligosaccharides	
ABSTRACT	45
1 INTRODUCTION	45
2 MATERIALS AND METHODS	47
2.1 Enzyme preparation	47
2.2 Enzyme preparation	47
2.3 Enzyme activity assay	48
2.4 Enzymatic Synthesis of isomaltooligosaccharides	48
2.5 Strategy for elongation of isomaltooligosaccharides chain	48
2.6 Isomaltooligosaccharides characterization	49
3 RESULTS AND DISCUSSION	50
3.1 Enzyme synthesis of isomaltooligosaccharides in batch reactor	50
3.2 Isomaltooligosaccharides chain elongation	52
4 CONCLUSIONS	60
REFERENCES	61

Capítulo 4 – Effect of the cationic form of ion-exchange resins used as stationary phase for the chromatographic separation of isomaltooligosaccharides

ABSTRACT	65
1 INTRODUCTION	65
2 EXPERIMENTAL	67
2.1 Column packing with ion-exchange resins	67
2.2 Characterization of Columns by Tracer Pulse Experiments	67
2.3 Determination of adsorption isotherms of isomaltooligosaccharides	68
2.4 Definition of separation operating conditions of a simulated moving bed according to the equilibrium model	69
3 RESULTS AND DISCUSSION	70
3.1 Caracterização das colunas semipreparativas	70
3.2 Adsorption isotherms of maltooligosaccharides and other mono and disaccharides	71
4 CONCLUSIONS	77
REFERENCES	79
Capítulo 5 – Conclusões	82
Capítulo 6 – Perspectivas Futuras	83
Apêndices	84

1 INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos não digeríveis são carboidratos que apresentam propriedades físico-químicas e fisiológicas que são benéficas para a saúde do consumidor e, por este motivo, sua utilização como ingredientes alimentares aumentou rapidamente (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009). Eles têm várias funções fisiológicas, tais como a melhoria da microbiota intestinal com base na proliferação seletiva de bifidobactérias e a supressão de patógenos, estimulação da absorção de minerais, prevenção da cárie dentária, aumento da imunidade e a melhoria dos níveis de colesterol e glicose no sangue (NIMPIBOON *et al.*, 2011; PATEL; GOYAL, 2011). Os oligossacarídeos não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias benéficas são denominados pré-bióticos (GÄNZLE, 2012).

Os isomalto-oligossacarídeos (IMOs) são oligossacarídeos pré-bióticos, compostos por uma unidade de maltose e até oito unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,6 (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SAKO *et al.*, 1999). A função biológica dos IMOs está relacionada com a sua resistência à hidrólise pela glicosidase que, entre outros atributos, lhes permite permanecer por mais tempo no cólon (SAARELAN *et al.*, 2002). Os IMOs podem ser obtidos a partir de sacarose e maltose através da reação do acceptor utilizando a enzima dextrana-sacarase. Nesta reação, as unidades de glicose provenientes da hidrólise da sacarose são incorporadas no acceptor (maltose), formando oligossacarídeos. O grau de polimerização dos IMOs tem efeito em suas propriedades pré-bióticas. Os IMOs de cadeia longa são mais resistentes à digestão em seres humanos, deste modo, métodos alternativos de produção destes oligossacarídeos são desejáveis (RASTALL, 2010).

O processo de síntese enzimática resulta em uma ampla distribuição de IMOs com graus de polimerização diferentes. Além disto, estão presentes no meio reacional glicose e maltose (substratos não consumidos) e frutose (proveniente da hidrólise da sacarose). Estes monossacarídeos e dissacarídeos devem ser separados dos IMOs para manter a sua função de pré-biótico. (GRAMBLICKA; POLAKOVIC, 2007).

A separação dos IMOs dos demais componentes do meio reacional, pode ser efetuada por cromatografia de troca iônica. Em modo contínuo, esta separação pode ser implementada em processos baseados no princípio dos leitos móveis simulados, que permitem economia significativa tendo em vista uma menor diluição dos produtos, maiores purzas/recuperações e uma maior produtividade do adsorvente.

O projeto de um sistema de separação cromatográfica começa com a seleção de um adsorvente adequado. O conhecimento da forma das isotermas dos componentes é necessário para a compreensão do mecanismo de retenção, para estabelecer as condições ótimas e para o projeto da etapa cromatográfica das separações preparativas (CHILAMKURTHI *et al.*, 2012).

Considerando a possível aplicação dos IMOs em formulações de alimentos e seu papel benéfico na saúde humana, este trabalho teve por objetivo a síntese enzimática e a separação de IMOs pré-bióticos por cromatografia de troca iônica em escala preparativa. Para atingir este objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- Sintetizar e purificar a enzima dextrana-sacarase, obtida a partir da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, utilizando sacarose como substrato, de acordo com a metodologia empregada por Rodrigues *et al.* (2005) e Rabelo *et al.* (2006);
- Estudar a síntese enzimática dos IMOs pré-bióticos, utilizando como substrato os açúcares sacarose e maltose em reator de bancada;
- Determinar as condições ótimas para a produção dos IMOs e supressão da formação de dextrana, avaliando-se a concentração dos substratos (sacarose e maltose) e o tempo de síntese empregado;
- Estudar o alongamento da cadeia oligossacarídica mediante diferentes estratégias de adição de sacarose e maltose ao meio reacional em reator semi-contínuo;
- Identificar os isômeros dos IMOs sintetizados através de cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), caracterizando-os quanto ao seu grau de polimerização e concentração;
- Empacotar colunas preparativas com resinas poliméricas de troca iônica e identificar a forma iônica adequada para a separação dos IMOs, dentre as formas iônicas: protônica (H^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+);
- Determinar a porosidade das colunas preparativas e os coeficientes de partição de cada um dos IMOs, frutose, glicose e maltose através de experimentos cromatográficos do tipo pulso;
- Identificar as condições de operação de uma unidade de Leito Móvel Simulado, em termos das razões de velocidade líquido-sólido em cada seção, visando à

separação de IMOs com grau de polimerização superior a três (3) dos demais sacarídeos não pré-bióticos.

Esta tese é composta por cinco capítulos apresentados da seguinte forma:

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre a motivação dos estudos a respeito da síntese e separação cromatográfica dos IMOs pré-bióticos.

O capítulo 2 é composto pela revisão da literatura abordando a definição, os benefícios e a produção de IMOs pré-bióticos via síntese enzimática. Em seguida, são revisados os métodos de separação de IMOs, a cromatografia de troca iônica e a tecnologia do leite móvel simulado.

Os materiais e métodos, bem como resultados e sua discussão, são apresentados nos capítulos 3 e 4 sob a forma de dois artigos, a serem submetidos a periódicos científicos. No capítulo 3 é apresentado o artigo intitulado “Enzyme synthesis of long chain isomaltooligosaccharides” que investigou o efeito de diferentes esquemas de alimentação de sacarose e maltose ao meio reacional sobre o alongamento da cadeia oligossacarídica.

No capítulo 4 é discutida a influência das formas catiônicas (K^+ , Ca^{2+} , H^+ e Na^+) na separação de IMOs por cromatografia com resinas de troca iônica através do artigo “Chomatographic separation of isomaltooligosaccharides on ion-exchange resins: the effect of the cationic form”, aceito para publicação no periódico Adsorption Science & Technology.

Os capítulos 5 e 6 apresentam as conclusões gerais da tese e sugestões para trabalhos futuros, respectivamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Oligossacarídeos pré-bióticos

Os consumidores modernos estão cada vez mais preocupados com sua saúde e esperam que os alimentos que consomem sejam, além de saborosos e atraentes, seguros e saudáveis. Neste sentido, houve um aumento da demanda por determinados tipos de carboidratos, como os oligossacarídeos não digeríveis (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Estes compostos são ingredientes nutricionais, resistentes à ação de enzimas salivares e intestinais, que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade de uma ou mais bactérias intestinais benéficas, as quais produzem ácidos orgânicos e contribuem para a diminuição do pH, melhorando a saúde do hospedeiro. Devido a esta propriedade são reconhecidos como pré-bióticos (ANJO, 2004; GIESE *et al.*, 2011).

Os oligossacarídeos pré-bióticos estão em crescimento no mercado global e são reconhecidos como ingredientes importantes para manter e melhorar a saúde. Nas últimas três décadas, o mercado de alimentos funcionais esteve profundamente enraizado na Ásia, entretanto trata-se de um segmento da indústria de alimentos em rápido crescimento nos Estados Unidos e na Europa (GOFFIN *et al.*, 2011). A demanda mundial de alimentos pré-bióticos está estimada em torno de 167.000 toneladas, movimentando cerca de 390 milhões de euros (SIRÓ *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2012).

Oligossacarídeos pré-bióticos são naturalmente encontrados em plantas como, por exemplo, chicória (inulina), alcachofra e alho, bem como através de síntese enzimática (utilizando enzimas com glicosiltransferases, inulinases, pectinases e outras) ou síntese química por reações de transglicosilação de carboidratos de baixo grau de polimerização (GP), tais como sacarose ou lactose, em que uma enzima glicosiltransferase ou glicosidase adequada é utilizada (BROKL *et al.*, 2011; RASTALL, 2010; CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012; RODRIGUES, 2012; SAAD *et al.*, 2013).

Os pré-bióticos são definidos como “ingredientes alimentares seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas, na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro” (GIBSON *et al.*, 2010; ROBERFROID *et al.*, 2010).

De acordo com Gibson *et al.* (2004), um ingrediente alimentar deve satisfazer três critérios para ser classificado como pré-biótico:

- 1) resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção gastrointestinal;
- 2) ser fermentado pela microbiota intestinal;
- 3) estimular seletivamente o crescimento e/ ou atividade de bactérias intestinais associadas à saúde e ao bem-estar.

Os oligossacarídeos pré-bióticos incluem fruto-oligossacarídeos, glico-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos (IMOs), oligossacarídeos de soja, galacto-oligossacarídeos, gentilo-oligossacarídeos, isomaltulose, lactosacarose, malto-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos (LOMAX; CALDER, 2009; PATEL; GOYAL, 2011).

Devido aos vários efeitos benéficos à saúde atribuídos aos oligossacarídeos pré-bióticos, eles são utilizados em produtos alimentares como agentes anticariogênicos e umectantes de baixa doçura (PATEL; GOYAL, 2011). Para serem incorporados a produtos alimentares, os pré-bióticos não devem afetar negativamente as propriedades sensoriais do produto e precisam ser estáveis durante o processamento dos alimentos em que são aplicados tratamentos de calor, baixo pH e condições de reação de Maillard (WANG, 2009).

Tais compostos podem ser formulados na forma de pó ou xarope, e comercializados como suplementos ou incorporados a produtos alimentares como pães, bolos, chocolates, bebidas (suco de frutas, café, chá, refrigerante e bebidas alcoólicas), produtos lácteos (iogurte, leite em pó e sorvete), sobremesas (geléia e pudim) e produtos de confeitaria (doce, biscoito e cereais matinais) (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL 2012; MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

2.2 Isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos

Dentre os oligossacarídeos pré-bióticos, os IMOs têm atraído bastante interesse, uma vez que eles apresentam propriedades que favorecem sua aplicação na indústria de alimentos. Apresentam elevada estabilidade, baixa viscosidade, baixa doçura, elevada capacidade de retenção de umidade e baixa atividade de água. Estas propriedades lhes permitem preservar a textura, evitar a contaminação microbológica e retardar a degradação dos alimentos (GOFFIN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2010).

Os IMOs são compostos por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6), incluindo, entre outros, isomaltose, panose, isomaltotetraose,

isomaltopentaose, nigerose e kojibiose (BIONEUTRA, 2008; CHUNG, 2006; RASTALL, 2010). Caracterizam-se por serem moléculas flexíveis possuindo uma variedade de conformações e auto-associações em dímeros e trímeros não covalentes e uma larga distribuição de tamanhos (MOTAWIA *et al.*, 2005). Dependendo do grau de ramificação, do comprimento da cadeia polimérica e da sua massa molar, podem apresentar propriedades de doçura, viscosidade, solubilidade e não digestibilidade variáveis, o que determina sua aplicação industrial, farmacêutica ou alimentícia (GOULAS *et al.*, 2004).

A composição (tipos de ligação e grau de polimerização) das misturas pré-bióticas é o fator chave para a sua eficiência na relação estrutura/ função, bem como na possível digestão parcial por enzimas nativas que pode ocorrer antes de atingirem o cólon (SANZ; GIBSON; RASTALL, 2005). Consequentemente, o substrato, tipo de enzima e especificidade, juntamente com o controle preciso da reação enzimática são pontos críticos para produzir IMOs com elevado potencial pré-biótico (GOFFIN *et al.*, 2010).

Os IMOs de cadeia curta que apresentam baixa massa molar são parcialmente digeridos no intestino delgado (RASTALL, 2010). Ao contrário, os IMOs de cadeia longa são absorvidos em menor grau e permanecem por mais tempo no cólon, por isto os IMOs de cadeia longa tendem a ser preferidos em relação aos de cadeia curta (DEBNAM, 1998; KANEKO, 1994; LEE, 2008).

O processo de fermentação pode ser utilizado para obtenção de oligossacarídeos pré-bióticos, mas a produção através de síntese enzimática apresenta maior produtividade e é mais fácil de ser controlada (CHUNG; DAY, 2002, 2004). Na síntese tradicional (batelada) não há formação de oligossacarídeos de cadeia longa, sendo a obtenção destes produtos de interesse tecnológico e nutricional, uma vez que apresentam vantagens sobre os de cadeia curta, no que se refere ao seu efeito pré-biótico no organismo humano.

2.3 Benefícios dos isomalto-oligossacarídeos

Os pré-bióticos têm sido associados a uma variedade de benefícios à saúde, incluindo um aumento na biodisponibilidade de minerais, especialmente o cálcio (ROBERFROID *et al.*, 2010), à modulação do sistema imune, prevenção de infecções gastrintestinais (LOMAX; CALDER, 2009; SEIFERT; WATZL, 2007), regulação de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade e redução do risco de câncer (LIONG, 2008; PARNELL; REIMER, 2009; PETERS *et al.*, 2009).

De acordo com Alípio (2000), os IMOs atingem o intestino grosso sem ser digeridos e por isto servem de alimento para o crescimento de bactérias benéficas (bifidobactérias e lactobacilos). Vale ressaltar que *E. coli*, *Clostridium perfringens* e outras bactérias intestinais malélicas não podem fermentá-lo, portanto não proliferam, o que melhora a flora intestinal. Outra característica importante é a baixa cariogenicidade.

Oligossacarídeos ramificados como isomaltoses, isomaltotrioses, panoses, etc., não são substratos para a glicosil-transferase do *Streptococcus mutans* sintetizar os glucanos insolúveis em água, que são responsáveis pela aderência da bactéria aos dentes, além de serem muito pouco utilizados pelo microrganismo para formar o ácido láctico que desmineraliza o esmalte do dente (ALIPIO, 2000).

IMOs são também conhecidos pelo seu potencial para ativar o sistema imunitário e para melhorar o metabolismo lipídico, bem como as funções do fígado e dos rins (GOFFIN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2009).

2.4 Produção enzimática de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos

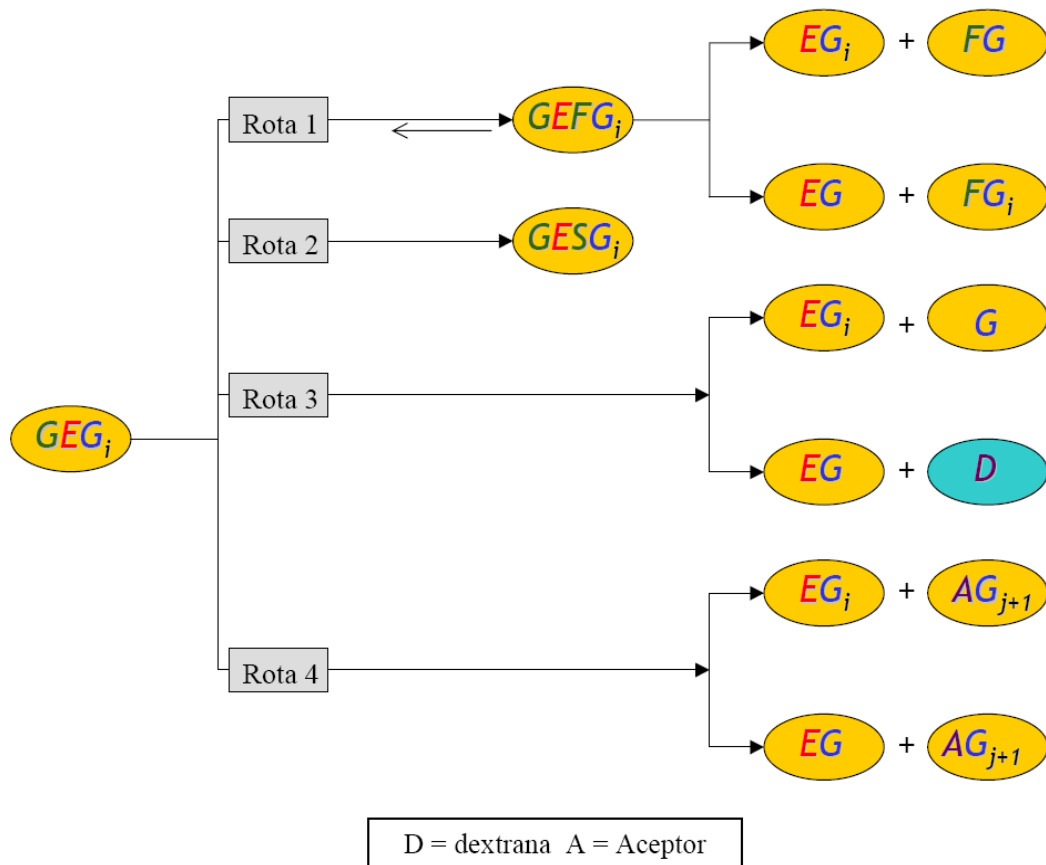
Neste processo, a estrutura dos IMOs é formada a partir da polimerização das unidades de glicose obtidas através de uma reação enzimática de transglicosilação de outro polissacarídeo (amilose, sacarose e amilopectinas) utilizando-se a enzima dextrana-sacarase, uma glicosiltransferase extracelular, produzida por várias espécies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Esta enzima catalisa a formação de dextrana quando presente em meio contendo sacarose como único substrato.

Em meio contendo um aceptor (maltose, frutose, glicose, etc.) como substrato predominante e sacarose como segundo substrato, há o desvio de algumas unidades de glicose que seriam utilizadas na formação de dextrana, para a obtenção de oligossacarídeos pré-bióticos. Esta reação secundária é denominada reação do aceptor (HEINCKE *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2005; RABELO *et al.*, 2006). Dentre os diversos aceptores, Díez-Municio *et al.* (2012), ressaltam que a maltose é reconhecida como um forte aceptor, proporcionando a síntese de uma série de oligossacarídeos produtos do aceptor, tais como panose e outros IMOs.

O produto primário da reação quando se utiliza maltose como aceptor é o trissacarídeo panose. Quando há uma quantidade suficiente de panose, a mesma funciona como aceptor formando isomaltosil-1,6- α -O-D-maltose que atua como aceptor formando

séries homólogas (HEINCKE *et al*, 1999). Um esquema da síntese de oligossacarídeos a partir da reação do aceptor com a enzima dextrana-sacarase pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase na presença de aceptores. EG_i = complexo enzima cadeia crescente de dextrana; A = aceptor, G = glicose, S = sacarose, F = frutose, AG_{j+i} = produto do aceptor contendo $j+i$ unidades de glicose (oligossacarídeo resultante da reação do aceptor).



Fonte: RODRIGUES (2003).

A Figura 1 apresenta as possíveis rotas que podem ser seguidas após a formação do complexo enzima-glicose e início do crescimento da cadeia de dextrana através do mecanismo de inserção. De acordo com a *Rota 1*, o crescimento da cadeia é interrompido pela ação da frutose como aceptor. Ainda de acordo com essa rota, pode haver a liberação da cadeia e a formação de um novo complexo enzima-glicose, que dá início ao crescimento de uma nova cadeia de dextrana. A *Rota 2* indica a terminação da cadeia pela ação da sacarose como aceptor. Já a *Rota 3* apresenta o curso normal da formação de dextrana. A *Rota 4* apresenta a reação do aceptor (maltose).

A reação do acceptor da dextrana-sacarase tem uma vantagem potencial no processo de produção de IMOs devido a sua capacidade de controlar o comprimento da cadeia de oligossacarídeos através de um equilíbrio das concentrações do doador (sacarose) e acceptor (maltose) (LEE *et al.*, 2008).

De acordo com o mecanismo de inserção na presença de aceptores, proposto por Robyt & Walseth (1978), a terminação da cadeia de dextrana ocorre devido ao ataque nucleofílico do acceptor ao complexo dextrana-enzima. Segundo este mecanismo, o acceptor é inserido na extremidade redutora da cadeia, cessando o seu crescimento e permitindo que o sítio ativo da enzima seja liberado para o início de uma nova cadeia. Entretanto, um estudo realizado por Rodrigues, Lona, & Franco (2005) baseado na existência de um sítio intermediário para o acceptor, verificada por Kitaoka & Robyt (1999), mostrou que o acceptor se liga a este sítio e então as unidades glicosídicas da sacarose são desviadas da cadeia de dextrana e utilizadas na formação dos oligossacarídeos. A partir desta observação, levantou-se a hipótese de que a síntese de oligossacarídeos e de dextrana são paralelas e independentes e que o acceptor não é terminador de cadeia dextrana. Portanto, seria possível realizar a síntese de oligossacarídeos considerando o alongamento da cadeia dos mesmos através da alimentação continuada de substrato (maltose e sacarose) ao reator.

Lee *et al.* (2008), realizaram um estudo para estabelecer um processo otimizado para a síntese industrial de IMOs de cadeia longa em reator batelada, analisando as condições de reação da enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, alterando as proporções de sacarose e maltose (variando em 1:4, 1:2 e 2:1) e a quantidade de cada açúcar (2% a 20% p/v). Como resultado, uma relação 2:1 (sacarose/maltose, 10:5% ou 20:10%, p / v) foi determinada como uma ótima condição para a síntese de IMOs de cadeia longa com rendimentos relativamente superiores (70 e 90%, respectivamente).

2.5 Métodos de purificação de oligossacarídeos pré-bióticos

Uma vez que a principal aplicação dos oligossacarídeos se destina ao consumo humano, o mesmo deve apresentar um elevado grau de pureza, de modo que a purificação deste produto é um requisito indispensável. A integração entre as tecnologias de purificação de produtos e enzimática é um pré-requisito para a produção bem sucedida de sacarídeos biofuncionais produzidos enzimaticamente (HUGHES *et al.*, 2007; PINELO; JONSSON; MEYER, 2009; VARDAKOU *et al.*, 2008) como, por exemplo, os IMOs.

Ao final da síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos (FOS), por exemplo, estão presentes no meio reacional, além destes, uma grande quantidade de glicose, sacarose (substrato não consumido) e uma pequena porção de frutose (proveniente da hidrólise da sacarose). Estes monossacarídeos e dissacarídeos devem ser separados dos FOS para manter a sua função pré-biótica (GRAMBLICKA; POLAKOVIC, 2007; KUHN; MAZUTTI; MAUGERI, 2012). No entanto, a separação de misturas complexas de oligossacarídeos não é simples, devido à semelhança estrutural dos carboidratos com o mesmo peso molecular. Além disso, a identificação dos mesmos é dificultada pela ausência de padrões comerciais disponíveis (BROKL *et al.*, 2011).

Vários métodos de purificação dos IMOs têm sido aplicados, como: fermentação com leveduras (PAN; LEE, 2005), processos de separação por membranas e cromatografia (DEMUTH *et al.*, 2002), sendo esta última cada vez mais utilizada, na separação e purificação de produtos farmacêuticos e de química fina (SCHRAMM *et al.*, 2003). No entanto, diversas técnicas cromatográficas também têm sido utilizadas para separar os oligossacarídeos em frações de menor complexidade ou estruturas individuais, com o objetivo de caracterizar as suas funções biológicas (FINKE, 2000). Estas técnicas incluem, por exemplo, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de exclusão por tamanho (CET), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase inversa e cromatografia de troca iônica (GEISSER *et al.*, 2005).

A cromatografia líquida apresenta alta seletividade, pureza e rendimento e pode ser uma técnica útil para a separação de misturas de açúcares simples e oligossacarídeos. Tem sido utilizada em grande escala na indústria alimentar para separar frutose de glicose (AZEVEDO; RODRIGUES, 2001). Vaňková, Gramblička e Polakovic (2010) avaliaram a separação por adsorção de fruto-oligossacarídeos de uma mistura de frutose, glicose e sacarose utilizando a resina de troca catiônica Amberlite CR1320 na forma catiônica Ca^{2+} . Todas as isotermas de equilíbrio determinadas através da cromatografia frontal utilizando-se uma temperatura de 60°C e concentração de sacarídeos de até 400 g/L foram lineares e os coeficientes de distribuição dos sacarídeos diminuíram com o seu peso molecular demonstrando o efeito de exclusão da resina. Diversos autores estudaram a separação de monossacarídeos/dissacarídeos/oligossacarídeos utilizando resinas de troca iônica e verificaram que as isotermas de adsorção eram lineares, além disso, foi observado que a adsorção diminui com o aumento do peso molecular mostrando que o mecanismo de separação baseia-se na exclusão por tamanho (GRAMBLICKA; POLAKOVIC, 2007; CHILAMKURTHI *et al.*, 2012; VENTE *et al.*, 2005).

As separações cromatográficas são inerentemente descontínuas e levam a produtos de separação bastante diluídos, mesmo em escala preparativa. A tecnologia do Leito Móvel Simulado (LMS) foi estabelecida como das mais eficientes para a separação e purificação de misturas de açúcares, porque pode proporcionar altas purezas e baixas diluições mesmo em fases estacionárias com pequeno fator de separação utilizando colunas com poucos pratos teóricos (em relação a colunas analíticas).

A Cromatografia de LMS tem o potencial de aumentar a produtividade e reduzir o consumo de fase móvel em comparação com a cromatografia de eluição em batelada. Ela permite a separação contra-corrente contínua da alimentação em duas correntes de produtos (refinado e extrato). A tecnologia LMS é aplicável para todos os tipos de cromatografia, tendo sido utilizada durante muitos anos na indústria de açúcar para as separações em grande escala (por exemplo, fracionamento de palatinose - trealulose) (SCHULTE; STRUBE, 2001; GEISSER et al., 2005).

Alguns estudos podem ser encontrados na literatura, envolvendo o uso de cromatografia de leito móvel simulado, na separação de diversos açúcares. Geisser *et al.* (2005) utilizaram a técnica para separação de oligossacarídeos em leite humano; Nobre *et al.* (2010), utilizaram na purificação de fruto-oligossacarídeos; Kawase *et al.* (2001) e Pilgrim *et al.* (2006) utilizaram na produção de lactosucrose, dentre outros.

2.6 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é uma técnica bastante difundida, tendo em vista a sua aplicabilidade em amostras que contenham íons, possuindo boa reprodutibilidade e confiabilidade. Esta técnica cromatográfica é comumente utilizada para purificar proteínas, apresentando as seguintes características: simplicidade, facilidade de ampliação de escala, alta resolução, alta capacidade de adsorção e versatilidade.

Nesta técnica cromatográfica, uma resina (fase estacionária) possui trocadores iônicos (catiônicos ou aniônicos) e é normalmente formada a partir de polímeros de estireno e divinil-benzeno ou de sílicas funcionalizadas. O mecanismo que rege o processo de separação na cromatografia de troca iônica é o da interação eletrostática entre as cargas dos compostos da amostra e os contra-íons da fase estacionária. Os grupos derivados do ácido sulfônico e do ácido carboxílico são utilizados para a troca de cátions, enquanto que os sais de amônio quaternário e aminas são utilizados como trocadores de ânions (KLEIN, 2010). A utilização

de uma resina catiônica ou aniônica dependerá do objetivo da cromatografia e do tipo de substância que se deseja purificar.

As resinas trocadoras de íons são classificadas em fortes e fracas. Esta classificação não está relacionada à força de ligação entre o analito e a resina, mas sim ao grau de ionização dos grupos ligantes (carga) da resina. Trata-se de uma analogia à classificação química quanto ao pKa de ácidos e bases em fortes e fracos. Resinas trocadoras fortes são aquelas carregadas em uma ampla faixa de pH, enquanto as fracas são carregadas em uma faixa mais estreita de pH (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). Por apresentarem uma faixa mais ampla de operação, trocadores fortes são preferíveis em detrimento de trocadores fracos.

A maioria dos estudos na literatura relatados à separação de açúcares emprega polímeros sulfonados, geralmente um copolímero de estireno-divinilbenzeno (DVB), para a fabricação de resinas de troca iônica (LUZ *et al.*, 2008; VENTE *et al.*, 2005). Estas resinas podem ser funcionalizadas com cátions, geralmente de potássio, cálcio ou sódio. Estes cátions formam complexos com o grupo hidroxila do açúcar adsorvido, levando a uma adsorção seletiva de acordo com a orientação do grupo hidroxila. Assim, a conformação do açúcar e o cátion determinam o coeficiente de distribuição e a afinidade entre o cátion e o açúcar (NOBRE *et al.*, 2009). O tipo de íon e o grau de reticulação são as características mais importantes de cada resina, pois influenciam em seu desempenho de separação. Outras importantes propriedades das resinas são: baixo custo, não toxicidade, estabilidade mecânica, química e biológica (VAŇKOVÁ; GRAMBLIČKA; POLAKOVIC, 2010).

Lei *et al.* (2010) determinaram as isotermas de adsorção de monossacarídeos em cinco resinas catiônicas de estireno-divinilbenzeno sulfonadas com diferentes reticulações (DVB) e diferentes cátions (K^+ , Ca^{2+} , e Fe^{3+}) fixados em grupos sulfônicos a uma temperatura de 25°C para avaliar a separação de uma mistura de xilose, glicose e arabinose por cromatografia de troca iônica. Os resultados mostraram que as isotermas de equilíbrio desses sacarídeos foram descritas como lineares e que os cátions e o grau de reticulação foram fatores importantes que influenciaram o comportamento de adsorção. A resina na forma Ca^{2+} e reticulada a 4% apresentou maior capacidade de adsorção para cada sacarídeo, enquanto que a resina na forma Ca^{2+} e reticulada a 6% apresentou maior fator de seletividade para as espécies de arabinose e xilose e a resina na forma Ca^{2+} e reticulada a 8% mostrou melhor desempenho na separação de xilose e glicose.

A concepção de um processo de separação cromatográfico em escala industrial inicia com a seleção de adsorventes adequados, o que requer o conhecimento das relações de

equilíbrio de adsorção dos diversos compostos na fase estacionária a uma dada temperatura, ou seja, é necessário determinar as isotermas de adsorção.

2.7 Isotermas de Adsorção

O processo de adsorção envolve a partição de uma substância (adsorbato) entre a fase fluida livre e a superfície do adsorvente (fase sólida). A capacidade de sorção de diferentes adsorventes é fortemente dependente da área superficial específica disponível, polaridade, pH e do grau de natureza hidrofóbica do adsorvente e adsorbato (NADEEM, 2006). As isotermas de equilíbrio de adsorção descrevem as relações entre as concentrações de equilíbrio do adsorbato na fase sólida e líquida a uma temperatura constante. As isotermas são informação fundamental na modelagem do fenômeno de adsorção, no projeto de equipamento industrial e/ou na determinação das condições de operação de uma planta.

As medidas das isotermas de adsorção podem ser realizadas por métodos estáticos e dinâmicos. Os métodos estáticos consistem na adição de volumes ou massas conhecidas de adsorventes a uma solução de volume conhecido, contendo solutos em concentrações iniciais definidas. A mistura é então agitada num recipiente fechado até que o equilíbrio seja alcançado. A concentração final na solução é determinada por métodos analíticos padrões. A quantidade adsorvida no estado de equilíbrio é calculada a partir do balanço de massa (SCHMIDT-TRAUB, 2005). Os métodos dinâmicos, também chamados de métodos cromatográficos, são: análise frontal, eluição por ponto característico, métodos de pulso e método do tempo de retenção (GUIOCHON *et al.*, 1994; PEDRUZZI *et al.*, 2008). São baseados na análise matemática das curvas de concentração de adsorbato à saída de uma coluna cromatográfica, sob fluxo constante, em resposta a mudanças bem definidas (pulso infinito, pulso quadrado, degrau, etc.) nas concentrações de alimentação da coluna.

No presente trabalho, optou-se pelo método de cromatografia de pulso, que é muito similar – do ponto de vista operacional – à cromatografia analítica. A técnica da cromatografia em pulso baseia-se na injeção de pulsos de adsorbato, de volume e concentração conhecido, na entrada de uma coluna cromatográfica empacotada com partículas adsorventes. O adsorbato é transportado continuamente por um líquido de arraste (fase móvel), interagindo com o adsorvente (fase estacionária) sob condições controladas de temperatura. A resposta ao pulso, registrada à saída da coluna na forma de um pico cromatográfico (Figura 2) com auxílio de um detector adequado, permite avaliar o equilíbrio termodinâmico e parâmetros de transferência de massa (ver equações 1 a 5 do capítulo 4).

Figura 2 - Pico de resposta a um pulso cromatográfico



2.7.1 Isoterma Linear

O modelo de equilíbrio de fases linear foi descrito por Henry e é válido quando a concentração do soluto é baixa, não há interação das moléculas do adsorbato umas com as outras e não há completa cobertura dos sítios de adsorção (RUTHVEN, 1984).

A relação entre a concentração na fase fluida e na fase sólida é descrita de forma linear de acordo com a Equação 1:

$$q^* = K.C \quad (1)$$

Onde q^* e C são as concentrações de equilíbrio do adsorbato na fase sólida e na fase fluida, respectivamente, e K é a constante de Henry. A grande maioria dos açúcares (mono-, di- e oligosacarídeos) apresenta isotermas de adsorção lineares em resinas de troca iônica numa ampla faixa de concentração. Estudos relatados Altenhöner *et al.* (1997); Lee e Lee (1992) e Viard e Lameloise (1992) demonstram que isotermas de adsorção de açúcares em resinas de troca iônica são lineares ao longo de um amplo intervalo de concentração (geralmente até 100 g/ L).

2.8 Processo cromatográfico contínuo

A cromatografia em leito móvel, conhecida como uma poderosa ferramenta para a separação contínua em contracorrente de misturas binárias, foi originalmente desenvolvida pela Universal Oil Products (UOP) (BROUGHTON; GERHOLD, 1961). Comparada com a cromatografia em batelada, a cromatografia em leito móvel apresenta diversas vantagens, tais

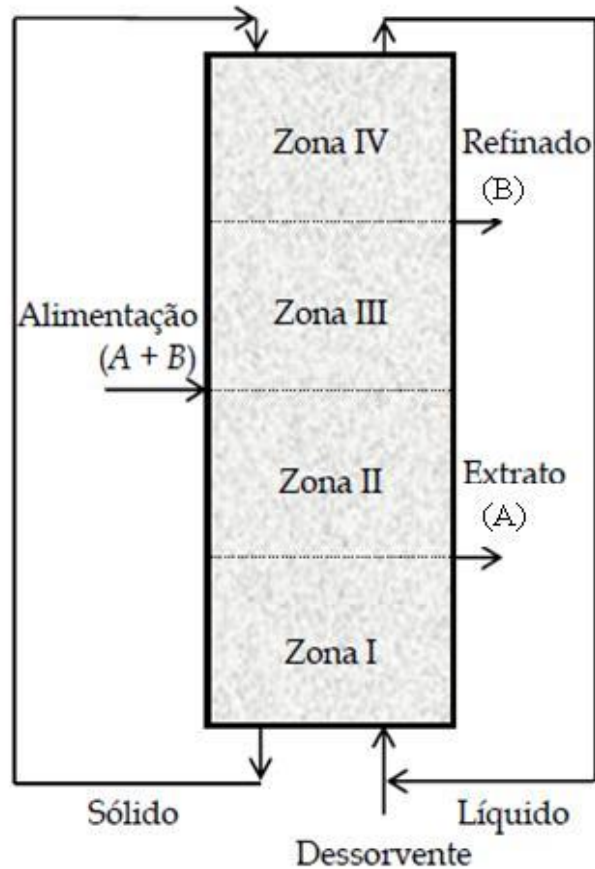
como uma maior produtividade, menor consumo de solventes, elevadas recuperações dos produtos com elevado grau de pureza, mesmo quando a seletividade é próxima da unidade ou a eficiência da fase estacionária é baixa. A cromatografia em leito móvel tem sido amplamente aplicada nas indústrias de açúcar, farmacêutica e petroquímica (MAI *et al.*, 2012).

Há dois conceitos principais de leitos móveis: o leito móvel verdadeiro (LMV) e o leito móvel simulado (LMS). O LMV é um sistema cromatográfico contínuo teórico, no qual há escoamento real da fase sólida adsorvente, efetuado em uma direção oposta ao escoamento da fase líquida (LUCENA, 1999). Em virtude das dificuldades associadas para promover o escoamento uniforme da fase sólida e do desgaste desta fase em razão do atrito, o escoamento contracorrente entre as fases sólida e líquida não ocorre em situações práticas. Pode ser obtido simulando o movimento da fase sólida mediante adequada e periódica troca nas posições das entradas e saídas do sistema, ao longo do leito que passa a ser composto por várias colunas conectadas em circuito fechado (Figura 3). Essas trocas são efetuadas em intervalos regulares e, dessa forma, acabam por promover um movimento relativo contracorrente dando origem ao leito móvel simulado (PESSOA JÚNIOR, KILIKIAN, 2005).

2.9 Leito móvel verdadeiro (LMV)

No LMV, as fases sólida e líquida escoam em direções opostas (sentido contracorrente). Contanto que as afinidades dos componentes A e B com relação à fase sólida sejam diferentes ($A > B$), é possível escolher vazões para fazer A movimentar-se com o sólido e B movimentar-se com o fluido, conduzindo a uma separação espacial, conforme apresentado na Figura 3. Esse sistema requer duas correntes de entrada (uma para a alimentação e outra para o dessorvente) e duas correntes de retirada (uma para o refinado B e outra para o extrato A) (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Figura 3 - Princípio básico do Leito Móvel Verdadeiro



O princípio básico do LMV é apresentado na Figura 3. O LMV clássico possui quatro zonas diferentes. O líquido (dessorvente limpo) que sai na zona IV é reciclado na zona I, enquanto que o sólido que sai regenerado na zona I é reciclado na zona IV. A zona I é localizada entre a entrada de dessorvente e saída de extrato, a zona II está entre as saídas de extrato e entrada de alimentação, a zona III separa a alimentação e retirada de refinado e a zona IV está localizada entre as retiradas de refinado e a alimentação de dessorvente (PAIS *et al.*, 1997).

Cada zona do LMV desempenha um papel específico na separação. Na zona I (entre a entrada de dessorvente e a saída de extrato), o produto mais retido (A) deve ser completamente dessorvido. Na zona II (entre o ponto de alimentação e saída de extrato), o produto menos retido (B) deve ser completamente dessorvido. Na zona III (entre o ponto de alimentação e saída do refinado), o produto mais retido (A) deve ser completamente adsorvido. Na zona IV (entre a saída de refinado e entrada de dessorvente), o produto menos retido (B) deve ser completamente adsorvido (NICLOUD, 2000; MAZZOTTI, *et al.* 1997a). Uma das maiores inconveniências do LMV é que o transporte do sólido é difícil de ser feito e

não ocorre de forma uniforme e, além disso, problemas de atrito podem provocar rápido desgaste mecânico do adsorvente.

2.10 Leito móvel simulado (LMS)

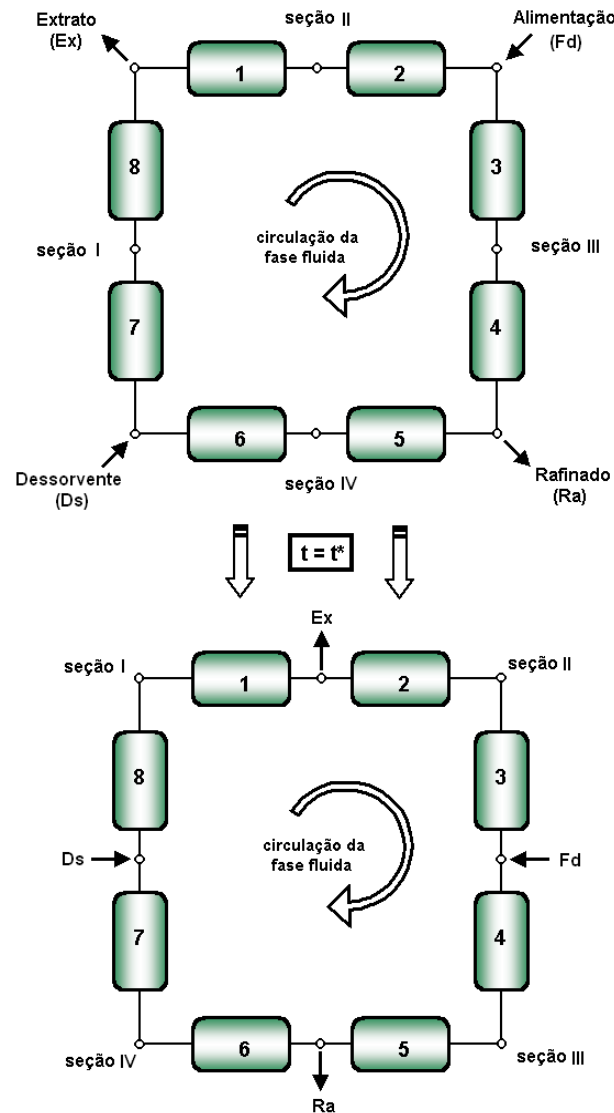
O leito móvel simulado (LMS) foi idealizado visando superar as dificuldades relativas à circulação do sólido no LMV e, quando bem projetada, a unidade pode realizar separações com a mesma eficiência que um leito contracorrente verdadeiro, sem requerer o movimento do adsorvente (CERUTTI, 2003).

O leito móvel simulado tem como base uma sequência de colunas de leito fixo, preenchidas com adsorvente, onde circula a fase fluida. Os pontos de injeção das correntes de entrada – alimentação e eluente – e retirada das correntes de produto da saída – extrato e refinado – são avançados uma ou mais colunas a intervalos de tempo regulares, chamado tempo de troca (t^*), na direção do escoamento da fase fluida. O movimento simultâneo das correntes de entrada e saída simula a operação contracorrente sólido/ líquido no equipamento sem, no entanto, movimentar o adsorvente, diferentemente do Leito Móvel Verdadeiro.

O esquema de um LMS com oito colunas e quatro seções é apresentado na Figura 4. Cada seção é dividida em subseções equivalentes ao número de colunas nesta seção, então esta figura representa um esquema 2-2-2-2, isto é, quatro seções contendo duas colunas cada uma (o primeiro valor refere-se à zona I, o segundo à zona II e assim respectivamente).

O leito móvel simulado de quatro seções é similar ao sistema contracorrente verdadeiro (Figura 3), com cada seção exercendo a mesma função. A diferença está no fato que a cada tempo de troca as seções deslocam-se ao longo da unidade, acompanhando os nós das correntes de alimentação e coleta.

Figura 4 - Unidade de Leito Móvel Simulado. Representação do avanço dos pontos de injeção e retirada das correntes em um tempo de troca t^* .



Em uma unidade de LMS, o volume extra-coluna nas tubulações e conexões entre as colunas deve ser corretamente considerado no projeto das condições operacionais. Em particular, esse problema cresce em unidades de pequena escala em que o volume morto extra-coluna chega a ser similar ao próprio volume da coluna (PEDEFERRI *et al.*, 1999). Sendo Q_j^{LMS} a vazão volumétrica da fase fluida no LMS em mL min^{-1} numa dada seção j , t^* o tempo de troca em minutos, V o volume da coluna em mL e ε a porosidade do leito, conforme apresentado na equação 2 (AZEVEDO; RODRIGUES, 1999):

$$\gamma_j = \frac{U_{F_j}}{U_S} \Big|^{LMV} = \frac{Q_j t^*}{\varepsilon V_c} \Big|^{LMS} - 1 \quad (2)$$

em que γ_j é definido como a razão entre a velocidade do fluido e da fase sólida, em cada seção, considerando um leito móvel verdadeiro.

2.11 Teoria do equilíbrio (método do triângulo)

A teoria do equilíbrio, ou método do triângulo fornece as condições operacionais do processo LMS que produzem 100% de separação no caso em que a mistura axial e a resistência ao transporte de massa forem negligenciáveis, isto é, assumindo um modelo ideal (STORTI *et al.*, 1993). Nessa metodologia, o desempenho de separação depende apenas dos parâmetros de equilíbrio que definirão as razões de velocidade líquido-sólido nas quatro seções da unidade do LMS.

Para as isotermas lineares, considerando uma unidade de separação contracorrente de LMV de quatro seções, a região de completa separação pode ser facilmente expressa em termos das razões de vazão em cada seção da unidade. A região de completa separação, definida pelo plano (γ_2, γ_3) , pode ser determinada teoricamente pelas restrições das vazões em cada zona da unidade LMS, conforme descrito nas equações 3-6 (STORTI *et al.*, 1993):

$$\text{Zona I: } \gamma_1 > vK_A \quad (3)$$

$$\text{Zona II: } vK_B < \gamma_2 < vK_A \quad (4)$$

$$\text{Zona III: } c \quad (5)$$

$$\text{Zona IV: } \gamma_4 < vK_B \quad (6)$$

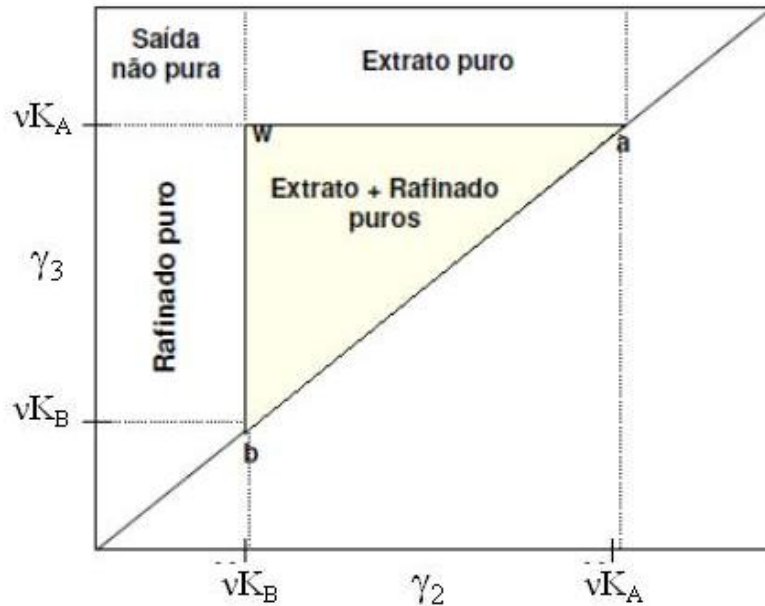
em que K_A e K_B são as constantes (Henry) de adsorção dos compostos A e B e v é a razão entre os volumes da fase sólida e líquida.

Essas restrições definem a região espacial de quatro dimensões cujas coordenadas são os parâmetros operacionais $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ e γ_4 e cujos pontos representam as condições de operação correspondentes à região de completa separação entre A e B. Estas restrições não dependem da concentração de alimentação, mas apenas dos coeficientes de Henry, desde que as isotermas sejam lineares. Considerando as zonas 2 e 3 de uma unidade LMS, os quais têm um papel fundamental no desempenho de separação, sendo $\gamma_2 < \gamma_3$, as restrições (3) e (4) podem ser reescritas como se segue (MAZZOTTI *et al.*, 1997b):

$$vK_B < \gamma_2 < \gamma_3 < vK_A \quad (6)$$

Essas inequações definem a projeção da região de completa separação em quatro dimensões em um plano (γ_2, γ_3), mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Representação da zona de completa separação obtida pela teoria do triângulo.



A região de separação corresponde ao triângulo awb. As coordenadas dos pontos a e b ao longo da diagonal são determinadas pelas constantes de Henry dos compostos menos retido (B) e mais retido (A), respectivamente (MIGLIORINI *et al.*, 2002). Qualquer ponto no interior deste triângulo garante a separação completa, desde que, obviamente, as restrições para γ_1 e γ_4 estejam atendidas. O ponto W é o ponto ótimo de operação em que a unidade funciona com sua vazão de alimentação máxima.

REFERÊNCIAS

- ALIPIO, R. Xarope de Isomalto-oligossacarídeo. **Food Ingredients**, v.9, p. 24-25, 2000.
- ALTENHÖNER, U.; MEURER, M.; STRUBE, J.; SCHMIDT-TRAUB H. Parameter estimation for the simulation of liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 769, p. 59-69, 1997.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.
- AZEVEDO, D. C. S., RODRIGUES, A. E. “Design of a Simulated Moving Bed in the Presence of Mass-Transfer Resistances”, **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 45, p. 956-966, 1999.
- AZEVEDO, D. C. S.; RODRIGUES, A. E. Fructose–glucose separation in a SMB pilot unit: Modeling, simulation, design, and operation. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 47, p. 2042-2051, 2001.
- BIONEUTRA. Stability of Isomalto-oligosaccharide (IMO). In: **Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27th January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients**. Canadá: Edmonton, 2008. p. 18-20.
- BROKL, M., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O., SORIA, A. C. SANZ, M. L. Evaluation of different operation modes of high performance liquid chromatography for the analysis of complex mixtures of neutral oligosaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7697– 7703, 2011.
- BROUGHTON, D. B., & GERHOLD, C. G. U.S. Patent No. 2,985,589, 1961.
- CERUTTI, E. L. **Separação de compostos petroquímicos em unidades de leito móvel simulado**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p.187–191, 2012.
- CHILAMKURTHI, S.; WILLEMSSEN, J.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; POIESZ, E.; OTTENS, M. High-throughput determination of adsorption equilibria for chromatographic oligosaccharide separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1239, p. 22– 34, 2012.
- CHUNG, C. H. Production of glucooligosaccharides and mannitol from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 fermentation and its separation from byproducts. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 325-329, 2006.
- CHUNG, C.H.; DAY, D.F. 2004. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. **Poultry Sci. Assoc.**, v. 83, p. 1302–1306, 2004.

CHUNG, C.H.; DAY, D.F. Glucooligoasaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential prebiotic. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.2, p. 196–199, 2002.

DANISCO US INC. DUAN, G., LI; F. SHETTY, J. K.; VADAKOOT J.; VADAKOOT, S.; Grain compositions containing pre-biotic isomalto-oligosaccharides and methods of making and using same. US 7.993.689 B2, 9 agosto, 2011.

DEBNAM, E. S.; DENHOLM, E. E.; GRIMBLE, G. K. Acute and chronic exposure of rat intestinal mucosa to dextran promotes SGLTI-mediated glucose transport. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, p.651-658, 1998.

DEMUTH, K., JORDENING, H. J., AND BUCHHOLZ, K. Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: newunconventional acceptors. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1811–1820, 2002.

DÍEZ-MUNICIO, M.; MONTILLA, A.; JIMENO, M. L.; CORZO,N.; OLANO,A.; MORENO, F.J. Synthesis and Characterization of a Potential Prebiotic Trisaccharide from Cheese Whey Permeate and Sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* Dextransucrase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1945–1953, 2012.

FINKE, B. **Isolierung und charakterisierung von oligosacchariden aus humanen und tierischen Milchen**. PhD Thesis. University of Giessen, Shaker Verlag, Aachen, Germany, 2000.

GÄNZLE, M .Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 116-122, 2012.

GEISSER, A.; HENDRICH, T.; BOEHM, G.; STAHL, B. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 1, p. 17-23, 2005.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004.

GIBSON, G.R.; SCOTT, K. P.; RASTALL, R. A.; TUOHY, K. M.; HOTCHKISS, A.; DUBERT-FERRANDON, A.; GAREAU, M.; MURPHY, E. F.; SAULNIER, D.; LOH, G.; MACFARLANE, S.; DELZENNE, N.; RINGEL, Y.; KOZIANOWSKI, G.; DICKMANN, R.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; WALKER, C.; BUDDINGTON, R. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, 2010.

GIESE, E. C.; HIROSI, T.; LOURDES, M. D.; SILVA, R.; BARBOSA, A. M. Produção, Propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683-700, 2011.

GOFFIN, D.; DELZENNE, N.; BLECKER, C.; HANON, E.; DEROANNE, C.; PAQUOT, M. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through

the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 394-409, 2011.

GOFFIN, D.; WATHELET, B.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; MALMENDIER, Y.; PAQUOT, M. Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from *Aspergillus niger*. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 4, p. 607-616, 2010.

GOULAS, A. K.; FISHER, D. A.; GRIMBLE, G. K. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 327-338, 2004.

GRAMBLICKA, M.; POLAKOVIC, M. Adsorption equilibria of glucose, fructose, sucrose and fructooligosaccharides on cation exchange resins. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 52, p. 345-350, 2007.

HEINCKE, K.; DEMUTH, B.; JÖRDENIN, H. J.; BUCHHOLZ, K. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 523-534, 1999.

HUGHES, S. A.; SHEWRY, P. R.; LI, L.; GIBSON, G. R.; SANZ, M. L.; RASTALL, R. A. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 4589- 595, 2007.

KANEKO, T. T.; KOHMOTO, H.; KIKUCHI, M.; SHIOTA, H.; MITSUOKA, T. Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal Bifidobacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, p. 2288-2290, 1994.

KAWASE, M.; PILGRIM, A.; ARAKI, T.; HASHIMOTO, K. Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 453-458, 2001.

KITAOKA, M.; ROBYT, J. F. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC dextransucrase: kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentration. **Carbohydrate Research**, v. 32, p. 183-191, 1999.

KLEIN, A. C. **Cromatografia iônica como método analítico alternativo para a análise quantitativa de analitos**. 2010. 46p. Monografia. (Química Industrial) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A.; FILHO, F. M. Kinetic and mass transfer effects for adsorption of glucose, fructose, sucrose and fructooligosaccharides into X zeolite. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 127, 2012.

LEE, K. N.; LEE, W. K. A Theoretical model for the separation of glucose and fructose mixtures by using a semicontinuous chromatographic refiner. **Separation Science & Technology**, v. 27, p. 295-311, 1992.

LEE, M. S.; CHO, S. K.; EOM, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, T. J.; HAN, N. S. Optimized substrate concentrations for production of long-chain isomaltooligosaccharides using dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 1141-1145, 2008.

- LEI, H. ; BAO, Z.; XING, H.; YANG, Y.; REN, Q.; ZHAO, M.; HUIHUA HUANG, H. Adsorption Behavior of Glucose, Xylose, and Arabinose on Five Different Cation Exchange Resins. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 2, 2010.
- LI, J.; TAN, B.; MAI, K. Dietary probiotic Bacillus OJ and isomalto- oligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune re- sponses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 291, p. 35–40, 2009.
- LIONG, M-T. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in vivo evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 854-863, 2008.
- LOMAX, A. R.; CALDER, P. C. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 633-658, 2009.
- LUCENA, S. L. **Modelagem e simulação da separação das proteínas α -lactalbumina e β -lactoglobulina por cromatografia preparativa em resinas trocadoras de ânions utilizando leite móvel simulado**. 1999. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas , 1999.
- LUZ, D. A.; RODRIGUES, A. K. O.; SILVA, F. R. C.; TORRES, A. E. B.; CAVALCANTE, C. L.; BRITO, E. S.; AZEVEDO, D. C. S. Adsorptive separation of fructose and glucose from an agroin- dustrialwaste of cashewindustry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2455–2465, 2008.
- MAI, N. L.; NGUYEN, N. T.; KIM, J.; PARKA,H.; LEE, S.; KOOA, Y. Recovery of ionic liquid and sugars from hydrolyzed biomass using ion exclusion simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 67– 72, 2012.
- MAZZOTTI, M.; STORTI, G., MORBIDELLI, M. Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. **Journal of Chromatography A**, v. 769, p. 3-24, 1997a.
- MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Supercritical fluid simulating moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 786, p. 309-320, 1997b.
- MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; ZENONI, G.; MORBIDELLI, M. Shortcut experimental method for designing chiral SMB separations. **AIChE Journal**, v. 48, n. 1, p. 69-77, 2002.
- MOTAWIA, M. S.; DAMAGER, I.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L.; ENGELSEN, S. B.; HANSEN, S.; OGENDAL, L. H.; BAUER, R. Comparative study of small linear and branched - glucans using size exclusion chromatography and static and dynamic light scattering. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 143-151, 2005.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 587-597, 2007.

- NADEEM, M. ; MAHMOOD, A.; SHAHID, S. A.; SHAH, S. S.; KHALID, A. M.; MCKAY, G. Sorption of Lead from Aqueous Solution by chemically modified carbon adsorbents. **Journal of Hazardous Material**, v. 138, p. 604–613, 2006.
- NICOUD, R. M. In: Handbook of bioseparations. AHUJA, S., San Deigo: Academic Press, 2000, 722 p.
- NIMPIBOON, P.; NAKAPONG, S.; PICHYANGKURA, R.; ITO, K.; PONGSAWASDI, P. Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type i α -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 448-457, 2011.
- NOBRE, C.; RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. **Operating conditions of a simulated moving bed chromatography unit for the purification of fructooligosaccharides**. IN: Semana de Engenharia, 11 a 15 de outubro. Guimarães, Portugal, 2010. Disponível em: <http://www3.dsi.uminho.pt/seeum2010/CD/abstracts/1729_2.pdf.pdf>. Acesso em 26 nov. 2012.
- NOBRE, M.J. SANTOS, A. DOMINGUEZ, D. TORRES, O. ROCHA, A.M. PERES, I. ROCHA, E.C. FERREIRA, J.A. TEIXEIRA, L.R. RODRIGUES. Comparison of adsorption equilibrium of fructose, glucose and sucrose on potassium gel-type and macroporous sodium ion-exchange resins. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, p. 71, 2009.
- PAIS, L. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E. Separation of 1,1-*bi*-2-naphtholenantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 2, p. 245-257, 1997.
- PAN, Y.-C.; LEE, W.-C. Production of high-purity isomalto- oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 7, p. 797–804, 2005.
- PARNELL, J. A.; REIMER, R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 1751-1759, 2009.
- PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1119–1128, 2011.
- PEDEFERRI, M.; ZENONI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3735-3748, 1999.
- PEDRUZZI, I; SILVA, E. A. B.; RODRIGUES, A. E. Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. **Separation and Purification Technology**, v. 63, p. 600–611, 2008.
- PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, A. V. Purificação de Produtos Biotecnológicos. São Paulo: Manole, 2005.

PETERS, H. P. F.; BOERS, H. M., HADDEMAN, E.; MELNIKOV, S. M.; QVYJT, F: No effect of added beta-glucan or of fructooligosaccharide on appetite or energy intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 58-63, 2009.

PILGRIM, A.; KAWASE, M.; MATSUDA, F.; MIURA, K. Modeling of the simulated moving-bed reactor for the enzyme-catalyzed production of lactosucrose. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 2, p. 353-362, 2006.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v.70, p. 1–11, 2009.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 435–441, 2009.

RABELO, M. C.; HONORATO, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 31-40, 2006.

RASTALL, R. A. Functional oligosaccharides: application and manufacture. **Annual review of food science and technology**, v. 1, p. 305-339, 2010.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZTL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, M. J.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, N.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A. M.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British journal of Nutrition**, v. 104, n. 1, 2010.

ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. The Mechanism of Acceptor Reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B- 512F Dextranucrase. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 433-445, 1978.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como aceptor**. 2003. 250 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RODRIGUES, S. Fruit and fruit juices as vehicles for probiotic microorganisms and prebiotic oligosaccharides. In: RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N. (Eds.). **Advances in fruit processing technologies**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 247-262.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 28, p. 9–14, 2005.

RUTHVEN, D. M. Principles of Adsorption and Adsorption Processes. New York: John Wiley & Sons, 1984.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SAARELAN, M.; LAHTEENMAKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILA-S&HOLM, T. Gut bacteria & health foods-the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 99–117, 2002.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 69–80, 1999.

SANZ, M. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. **J Agric Food Chem.**, v. 53, n. 13, p. 5192– 5199, 2005.

SCHMIDT-TRAUB, H. **Preparative Chromatography: of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents**, 1 ed, Germany, Wiley Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005.

SCHRAMM, H.; KASPEREIT, M.; KIENLE, A.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Verbessertes Betrieb von Simulated Moving Bed-Prozessen durch zyklische Modulation der Feedkonzentration. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 75, n. 4, p. 379-383, 2003.

SCHULTE, M.; STRUBE, J. Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 906, n. 1-2, p. 399-416, 2001.

SEIFERT, S.; WATZL, B: Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2563S-2567S, 2007.

SILVA JÚNIOR, I. J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M. A. G.; SANTANA, C. C.; CARPES, M. J. S.; CORREIA, C. R. D. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, v. 29, p. 1027-1037, 2006.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, p. 456–467, 2008.

STORTI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M., CARRÁ, S. Robust Design of Binary Countercurrent Adsorption Separation Processes. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 39, p. 471-492, 1993.

VAŇKOVÁ, K.; GRAMBLIČKA, M.; POLAKOVIC, M. Single-Component and Binary Adsorption Equilibria of Fructooligosaccharides, Glucose, Fructose, and Sucrose on a Ca-Form Cation Exchanger. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 405–410, 2010.

VARDAKOU, M.; PALOP, C. N.; FAULDS, P. C.; NARBAD, A. Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora, **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 166–170, 2008.

VENTE, J. A.; BOSCH, H., HAAN, A. B.; BUSSMANN, P. J. T. Evaluation of sugar sorption, isotherm measurement by frontal analysis under industrial processing conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 71, p. 1066, 2005.

VIARD, V.; LAMELOISE, M. L. Modelling glucose-fructose by adsorption chromatography on ion exchange resins. **Journal of Food Engineering**, v. 17, p. 29-48, 1992.

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

ZHANG, L.; SU, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; SHI, J.; ZHU, Y.; JIANG, Y. Sandwich-structured enzyme membrane reactor for efficient conversion of maltose into isomaltooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9144-9149, 2010.

Enzyme synthesis of long chain isomaltooligosaccharides

Maria Cristiane Rabelo¹, Cláudia P. M. L. Fontes², Sueli Rodrigues², Diana Cristina Silva de Azevedo¹

ABSTRACT – Isomaltooligosaccharides (IMOs) are carbohydrates that promote the growth of beneficial bacteria in the large intestine, in particular bifidobacteria, and therefore are recognized as prebiotic. This work aimed to investigate the effect of different feeding strategies of sucrose and maltose to the reaction medium on the chain elongation of isomaltooligosaccharides. The synthesis was performed by adding 1UI/mL of enzyme to reaction medium containing sucrose and maltose as substrates. In the first strategy, only sucrose was added to the reaction medium at 2 hours intervals during 8 hours. In the second strategy, a mixture of sucrose and maltose was added to the reaction medium at 2 hours interval for 8 hours. In the third strategy, a mixture of sucrose and maltose was added for six hours. Then, only sucrose was added at each hour for six hours. The third strategy resulted in the isomaltooligosaccharides chain elongation up to degree of polymerization of 9. The increase in IMOs amount was also higher in the third strategy (79.04 g/L).

Keywords: isomaltooligosaccharides, acceptor reaction, polymerization degree.

1. Introduction

Besides nutrition, food is now considered a source of elements able to improve the consumer's healthy and life quality. Because of that, the consumer's choice is now target to foodstuffs that are able to provide some additional benefits such as functional compounds. Dextranase catalyzes dextran formation when sucrose is the only substrate. When besides sucrose an acceptor is also presented in the medium, the glucose moieties are deviated from the dextran growing chain to the acceptor molecule, which results in oligosaccharides synthesis. When maltose is the acceptor prebiotic isomaltooligosaccharides (IMO) are produced. (Heincke et al., 1999, Chung and Day, 2004, Rodrigues et al., 2005, Rabelo et al., 2006).

Prebiotic oligosaccharides are non digestible carbohydrates with degree of polymerization from 3 to 10, which are able to promote the growth of beneficial bacteria in

the colon (Mussatto & Mancilha, 2007; Patel & Goyal, 2011; Qiang, YongLie, & QianBing, 2009). These carbohydrates are selectively fermented by the bifidobacterium and lactobacillus increasing their counts and improving the host healthy ” (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004) . The consumption of prebiotic oligosaccharides have been associated to several health benefits such as: the increase of mineral bioavailability, the improvement of the immune system; the increase in the gastrointestinal flora with inhibition of pathogens microorganisms (Lomax & Calder, 2009; Patel & Goyal, 2011; Seifert & Watzl, 2007).

The research on functional foods and the number of products available in the market strongly increased last years. IMOs might be used as food ingredient in functional products due to their high stability, low viscosity, low sweetness, low caloric value, low water activity and high ability of water retention (Goffin et al., 2011; Zhang et al., 2010, Goffin et al., 2010). The IMOs are composed by glucose moieties linked by $\alpha(1\rightarrow6)$ glycoside linkage (Chung, 2006; Rastall, 2010). While short chain IMOs are partially digestible in the small intestine (Rastall, 2010), long chain IMOs are absorbed in lower degree presenting a higher residence time in the colon being more effective than the short chain ones (Debnam, Denholm, & Grimble, 1998; Kaneko, Kohmoto, Kikuchi, Shiota, & Mitsuoka, 1994; Lee et al., 2008).

IMOs can be produced by enzyme synthesis with dextransucrase in a medium containing sucrose and maltose as substrate. Maltose is the strongest known acceptor for dextransucrase and panose is the first acceptor product of a homologous series formed during the enzyme synthesis. Panose is a trisaccharide composed by one maltose and one glucose moiety linked to the maltose by an $\alpha(1\rightarrow6)$ glycosidic bond. When a sufficient amount of panose is reached in the medium, this trisaccharide acts as acceptor and forming isomaltosil-1,6- α -O-D-maltose, which might act as acceptor and so on (Heincke, Demuth, Jördening, & Buchholz, 1999; Rabelo, Honorato, Gonçalves, Pinto, & Rodrigues, 2006; Rodrigues, Lona, & Franco, 2006). This reaction is called acceptor reaction and presents the potential advantage of controlling the degree of polymerization through a proper balance between sucrose and maltose in the reaction medium (Lee et al., 2008).

However, the chain elongation of IMOs is still considered a technological challenge and only panose and maltotriose are obtained in large amounts in batch reactors. Thus, the aim of the present chapter is the study of IMOs chain elongation in batch reactor using different feed strategies of sucrose and maltose.

2. Materials and methods

2.1 Enzyme preparation

The bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F obtained from ARS Culture Bacterial Collection (NRRL Culture collection, United States Department of Agriculture, Peoria, IL, USA) was activated in an optimized synthetic medium composed of sucrose, 50 g/L (food grade); yeast extract, 20 g/L (Himedia); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L; NaCl, 0.01 g/L; and K_2HPO_4 (anhydrous), 20 g/L. The initial pH of the culture medium was adjusted to 6.5 with H_3PO_4 and the medium was autoclaved (121 °C/15 min). Activation was carried out in an orbital shaker (Tecnal TE 420) at 30°C and 150 rpm (Rabelo et al. 2006; Rodrigues et al. 2003) for 12 hours. Three percent of this cell culture was used as inoculum to produce dextransucrase in a feed batch fermentation process.

2.2 Enzyme preparation

Fermentation was carried out in an 1L TecBio Fermentor at 30°C with pH controlled at 6.5 (± 0.1); mechanical agitation of 150 rpm and aeration of 0.5 L/min in the same culture medium used for the strain activation above described. A solution containing NaOH (120 g/L) and sucrose (300 g/L) was fed into the fermentor to control the pH and sucrose level in the culture medium. After six hours of processing, the feed flow rate was interrupted and the pH was allowed to drop to 5.2, when the process was considered finished (Rodrigues, Lona, & Franco, 2005).

The cells were harvested by centrifugation at 11600g for 10 minutes at 4°C in a Sigma 6K-15 centrifuge. The enzyme was recovered by precipitation with polyethylene glycol (PEG 1500 50% v/v). The partially purified enzyme was then diluted in a sodium acetate buffer (20 mM) containing 0.05 g/L of CaCl_2 with pH adjusted to 5.2. The enzyme was stored frozen at -20 °C prior to use (Silva, Rabelo, & Rodrigues, 2012).

2.3 Enzyme activity assay

Enzyme activity was determined by quantifying the released fructose by the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method (Miller, 1959). The partially purified enzyme prepared as described above (4.5 mL) was mixed with 45.5 mL of a 10% (w/v) sucrose solution in sodium acetate buffer pH 5.2 (20 mM containing 0.05 g/L of CaCl₂) and then incubated for 1 h at 30°C. Samples of 1,0 mL were collected every 15 min and mixed with 1.0 mL of the DNS reagent to stop the reaction. The enzyme activity was calculated by linear regression and expressed in IU/mL (dextransucrase unit/mL). One international unit is defined as the amount of enzyme that releases 1 mmol of fructose per minute under ideal reaction conditions (30°C and pH 5.2) as described by Rabelo et al. (2009).

2.4 Enzymatic Synthesis of isomaltooligosaccharides

To evaluate the chain elongation the initial concentration of maltose and sucrose were changed. Carbohydrate concentration and the ratio maltose/sucrose were based on a previous published study where it was observed that maltose/sucrose ratios around 1.125 and 2.0 resulted in high oligosaccharide formation and productivity (Rabelo et al., 2006). Synthesis was carried out in a thermostated glass reactor (10 mL) using as substrate 10 mL of a sodium acetate buffer solution (20 mM + 0.05g/L of CaCl₂, pH 5.2) containing sucrose and maltose at the desired concentration (Table 1) and 1 IU/mL of dextransucrase. The essays were carried out at the optimum synthesis condition (30°C, pH 5.2) for 24 h (Rabelo et al. 2006).

At the end of the process, the dextran was precipitated by adding 3 volumes of ethanol 96% (v/v) and determined as total carbohydrate by the phenol sulfuric acid method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). The supernatant was used to determine the oligosaccharides by HPLC as described further on.

2.5 Strategy for elongation of isomaltooligosaccharides chain

After choosing the initial concentration of maltose and sucrose (40g/L of sucrose and 45 g/L of maltose) the chain elongation was evaluated using two different pulse fed strategies as presented in Table 1. Essays were carried as previously described. The working volume of

essays 1 and 2 was 10 mL, while essay 3 was carried using 40 mL of substrate. Sugars were diluted in sodium acetate buffer (20 mM) containing 0.05 g/L of CaCl₂ with pH adjusted to 5.2. Before each fed pulse samples of 2 mL were removed from the reactor for further analysis. To each sample 6 mL of ethanol 96% (v/v) were added to precipitate the dextran and stop the reaction. Samples were analyzed as previous described.

Table 1 – Sucrose and maltose pulse fed strategies for IMO oligosaccharides chain elongation: solely sucrose addition (1), addition of a mixture of sucrose and maltose (2), addition of a mixture of sucrose and maltose followed by solely maltose addition (3) in thermostated batch reactor at 30°C, pH 5.2 containing 1 UI/mL of dextransucrase.

Run	Fed strategy	Fed interval	Processing length
1	Sucrose (10 g/L)*	2 h	8 h
2	Sucrose (10 g/l) + Maltose (10 g/l) *	2 h	8 h
3	Sucrose (10 g/l) + maltose (10 g/l)	2 h	6 h
	Sucrose (10 g/l)	2 h	6 h

*Sugar fed in runs 1 and 2 were done using powder by adding 0.1 g of each sugar to the reactor, while fed in run 3 was done using liquid solutions.

2.6 Isomaltooligosaccharides characterization

The IMOs were characterized according to its degree of polymerization by Thin Layer Chromatography (TLC) on Whatman K6 silica plates, 250- μ m thickness (Whatman, Kent, UK) 20 x 20 cm. Diluted samples of 5 μ L were absorbed onto the plates on a line about 1.5cm above the lower plate edge. After drying with a hairdryer, the plate was irrigated for two ascents in a solvent mixture composed of acetonitrile:ethyl acetate:1-propanol: H₂O (85:20:50:90). For fructose, glucose, sucrose and maltose separation the same technique was applied using acetonitrile:water (85:15) as eluent and 3 ascents. To make sugars visible, the plates were sprayed to saturation with a solution containing 0.3% (w/v) of 1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride in methanol with 3% (v/v) sulfuric acid. The plates were then heated in an oven at 120°C until spots were visible (approximately 10 min).

IMOs were also quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) in a Varian ProStar system equipped with two high-pressure pumps model ProStar 210, refraction index detector model ProStar 355 RI and column oven (Timberline). Separation was achieved using a Rezex RSO-Oligosaccharide (200 x 10mm) column at 85 °C. Ultra pure water at 0.3

mL/min was used as eluent and the detector temperature was 35 °C. All samples were analyzed in triplicate. The software ProStar WS 5.5 was used to acquire and handle the data. Calibration curve was built using IMOs from Sigma-Aldrich with degree of polymerization from 3 to 7. Higher polymerization degrees are not available.

3 Results and discussion

3.1 Enzyme synthesis of isomaltooligosaccharides in batch reactor

Table 2 and Figure 1 present the results obtained changing the maltose/sucrose ratio and initial concentration. The use of maltose/sucrose ratio of 1.125 (essays 1 to 4) resulted in oligosaccharides with higher degree of polymerization (DP) compared to the ones where the ratio was 2.000 (essays 5 to 8). Essays 1 to 4 resulted in IMOs with degree of polymerization from 3 to 6. The IMOs obtained in essays 5 to 8 did not exceed DP5. According to the TLC plate, close concentrations of maltose and sucrose in batch reactor were better for chain elongation. Similar results were reported by Vergara, Honorato, Maia, & Rodrigues (2010), which studied oligosaccharides synthesis in cashew apple juice using dextransucrase of *L. mesenteroides* B-512 F.

Table 2. Substrate concentration and results obtained in IMOs synthesis using two different maltose/sucrose ratios: 1.125 (runs 1 to 4) and 2.0 (runs 5 to 8) in a stirred batch reactor (10 mL) at 30°C and pH 5.2.

Run	Sucrose (g/L)	Maltose (g/L)	Malt/Suc Ratio	IMOs (g/L)	Dextran (g/L)
1	10	11.25	1.125	7.07 ^a ± 0.03	2.56 ^a ± 0.08
2	20	22.5	1.125	13.49 ^b ± 0.06	2.95 ^b ± 0.18
3	30	33.75	1.125	24.29 ^c ± 0.01	3.85 ^d ± 0.07
4	40	45	1.125	20.67 ^d ± 0.08	2.77 ^{a,b} ± 0.10
5	10	20	2.000	7.38 ^a ± 0.49	2.59 ^a ± 0.09
6	20	40	2.000	15.73 ^e ± 0.05	4.39 ^c ± 0.11
7	30	60	2.000	17.87 ^f ± 0.01	4.16 ^c ± 0.08
8	40	80	2.000	18.93 ^g ± 0.42	4.75 ^f ± 0.03

Means followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey test (p < 0.05).

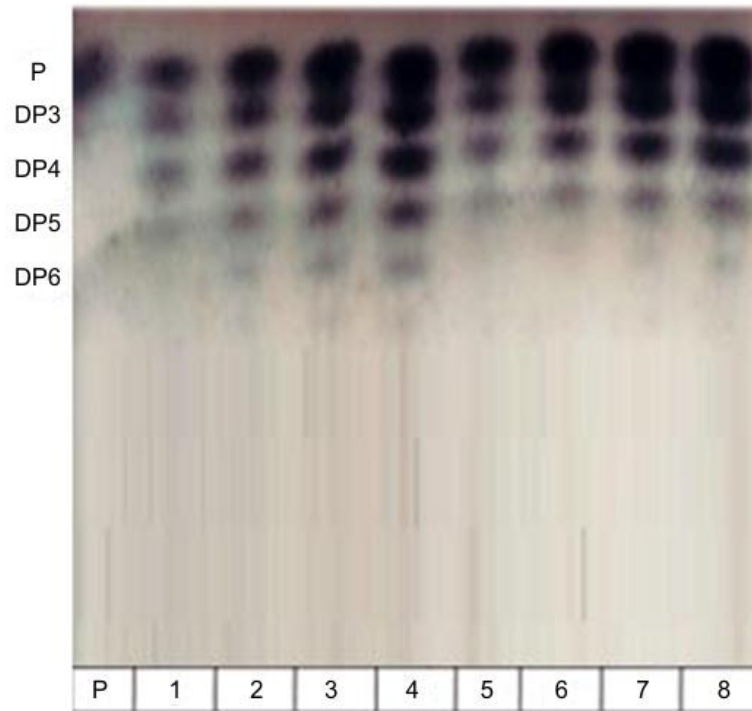


Figure 1. Thin layer chromatography of the IMOs obtained by enzyme synthesis in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1 UI/mL of dextransucrase. P represents the pattern containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the degree of polymerization of IMOs panose (DP3), maltotetraose (DP4), maltopentaose (DP5) and maltohexaose (DP6). Lanes 1-4 represent the assays 1 to 4 (ratio maltose / sucrose 1.125) and lanes 5-8 represent the assays 5-8 (ratio maltose / sucrose 2.0) (Table 2).

Results on Table 2 were compared by Tukey test at 95% of significance level ($p < 0.05$). Significant differences were found for all essays except for essays 1 and 5, where the lowest carbohydrate concentration was applied. Despite TLC analysis showed IMOs up to DP6, in HPLC analysis, only IMOs with DP3 (panose) and DP4 (maltotetraose) could be quantified because of the low amount of IMOs with DP higher than 4 (below the HPLC quantification limit of 0.4 g/L). TLC is a more sensible technique, which allows the detection and the visualization of samples containing only 50 ng of carbohydrate.

Higher IMOs concentrations were obtained in essays 3 and 4 where maltose/sucrose ratio was 1.125. Higher dextran was obtained in essay 3 despite the higher amount of IMOs. As dextran synthesis consumes glucose moieties that would be shifted to oligosaccharide

synthesis, essay 4 (40 g/of sucrose and 45 g/L of maltose) was chosen as the initial concentration for fed-batch studies.

When lower ratios maltose/sucrose was applied (1.125), the dextran formation was lower. This result was not expected because according to the acceptor reaction maltose excess suppresses the dextran synthesis. The same behavior was observed for oligosaccharides synthesis in cashew apple juice as reported by Silva, Rabelo, & Rodrigues (2012) who observed a higher oligosaccharide formation when acceptor/sucrose ratio was around 1.0. The results presented herein suggested that not only the ratio is responsible for the glucose moieties deviation from the dextran synthesis. The carbohydrates initial concentration might also affect the oligosaccharide formation.

3.2. Isomaltooligosaccharides chain elongation

The results obtained in a fed-batch reactor using two different fed strategies are presented in Figure 2. When only sucrose is fed into the reactor, the IOMs with degree of polymerization from 2 to 8 were obtained (Fig.2.a). On the other hand, when maltose and sucrose are fed into the reactor, IMO with no more than 5 glucose moieties (DP5) were obtained. Fig.2.b shows the glucose, fructose and maltose which were not separated in the plate presented in Fig.2.a. Fructose is released from the sucrose breakage as a natural byproduct of the synthesis. Maltose was not totally consumed probably due to the absence of glucose moieties to be polymerized into oligosaccharide. Residual glucose and sucrose were very low and were detected only in TLC due to the high analysis sensitivity. Figure 3 shows the concentration of IMOs determined by HPLC.

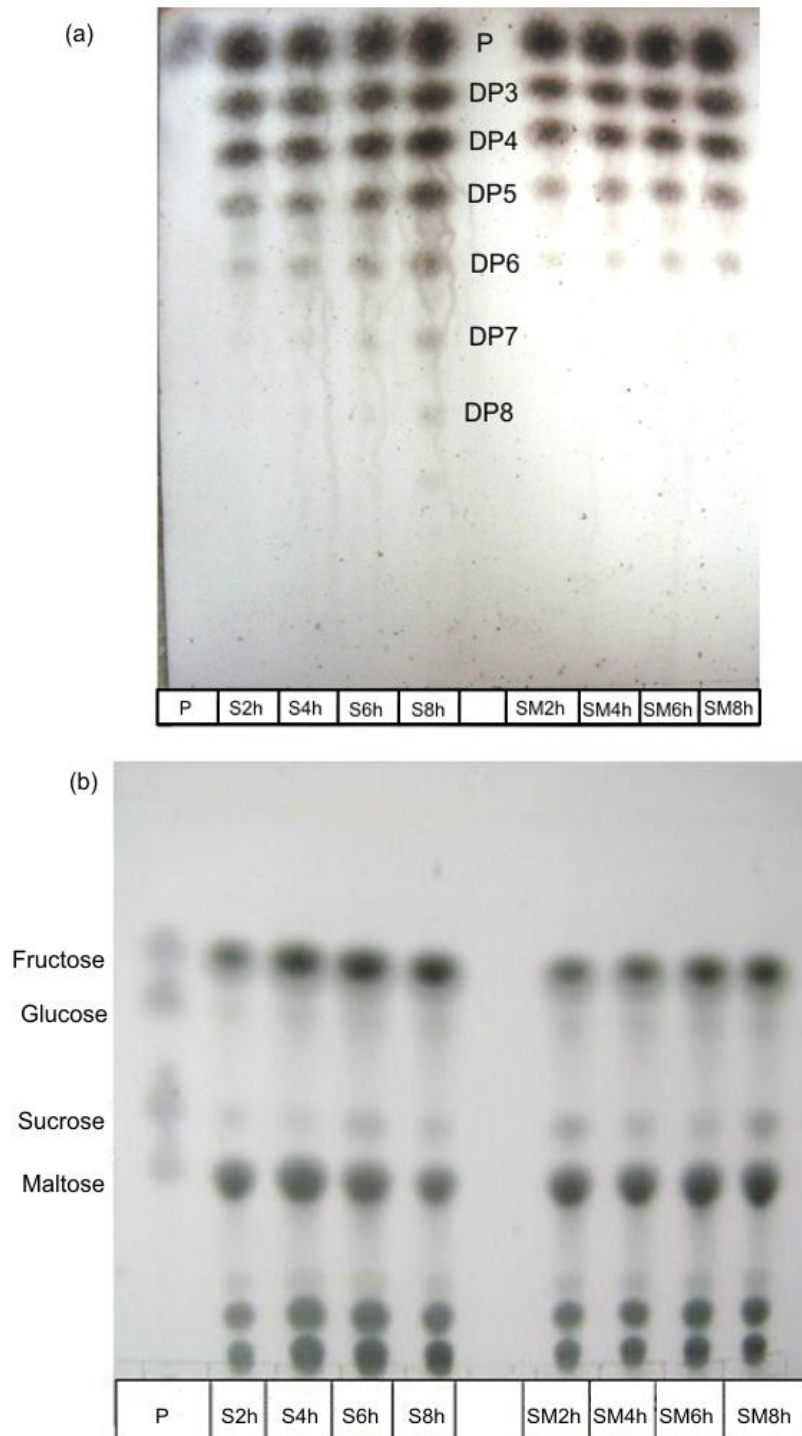


Figure 2. Thin layer chromatography of the IMOs (a) and mono- and disaccharides (b) from the synthesis: strategy 1 (Table 1): continued pulse addition of sucrose (lanes S2H to S8h) and strategy 2 (Table 1): combined addition of sucrose and maltose (lanes SM2h to SM8h) by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. P represents the pattern containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the degree of polymerization of IMOs.

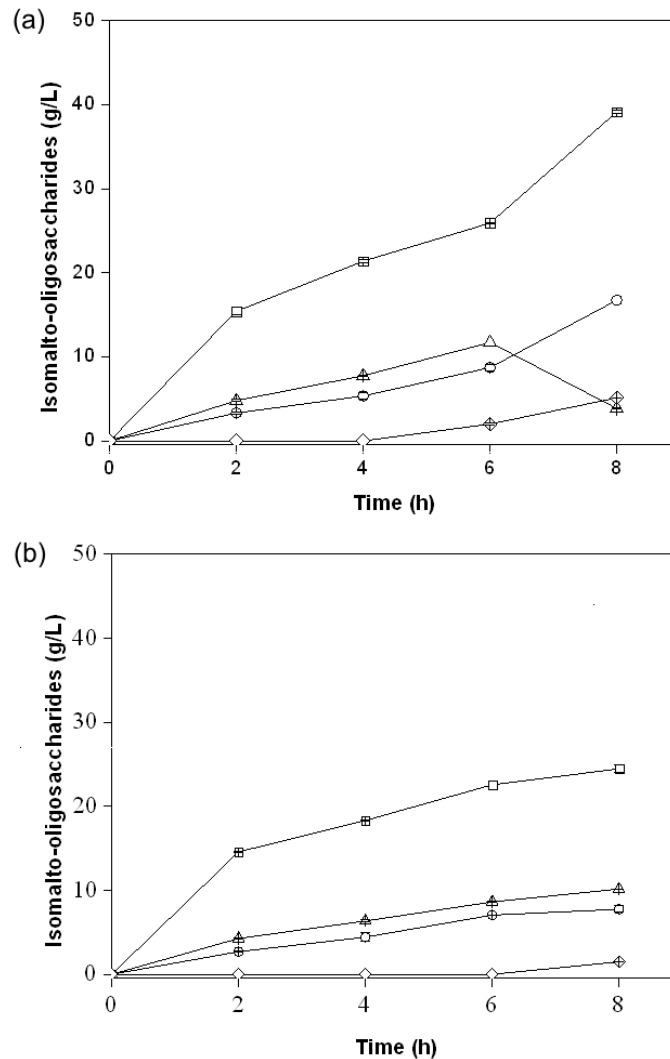


Figure 3. IMOs DP3(□), DP4 (○), DP5 (△) e DP6 (◇) from the synthesis with addition of sucrose (a) and combined addition of sucrose and maltose (b) by pulses in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1 UI/mL of dextransucrase.

As previously commented, despite IMOs with DP up to 8 were obtained in essay 1, the quantification was only possible for oligosaccharides with DP up to 6. Sucrose addition promoted the increase in oligosaccharide amount along the synthesis (Fig3.a). As panose, a trisaccharide composed by one maltose linked to one glucose moiety released from the sucrose (DP3), is the first oligosaccharide obtained in the homologous series, panose was the oligosaccharide with the higher concentration. The results are in agreement to the mechanism published by Heinck et al. (1999) where higher degrees of polymerization were obtained only when a sufficient amount of the previous acceptor was reached.

A different behavior was obtained when sucrose and maltose were simultaneously fed into the reactor (Fig.3b.) Lower concentration of panose was obtained and similar amounts of oligosaccharides with DP higher than 3 were obtained. These results suggest that some substrate inhibition might have occurred due to the high acceptor concentration in the reaction medium when sucrose and maltose were fed together. Figure 4 presents the total IMO and the dextran formed during the synthesis.

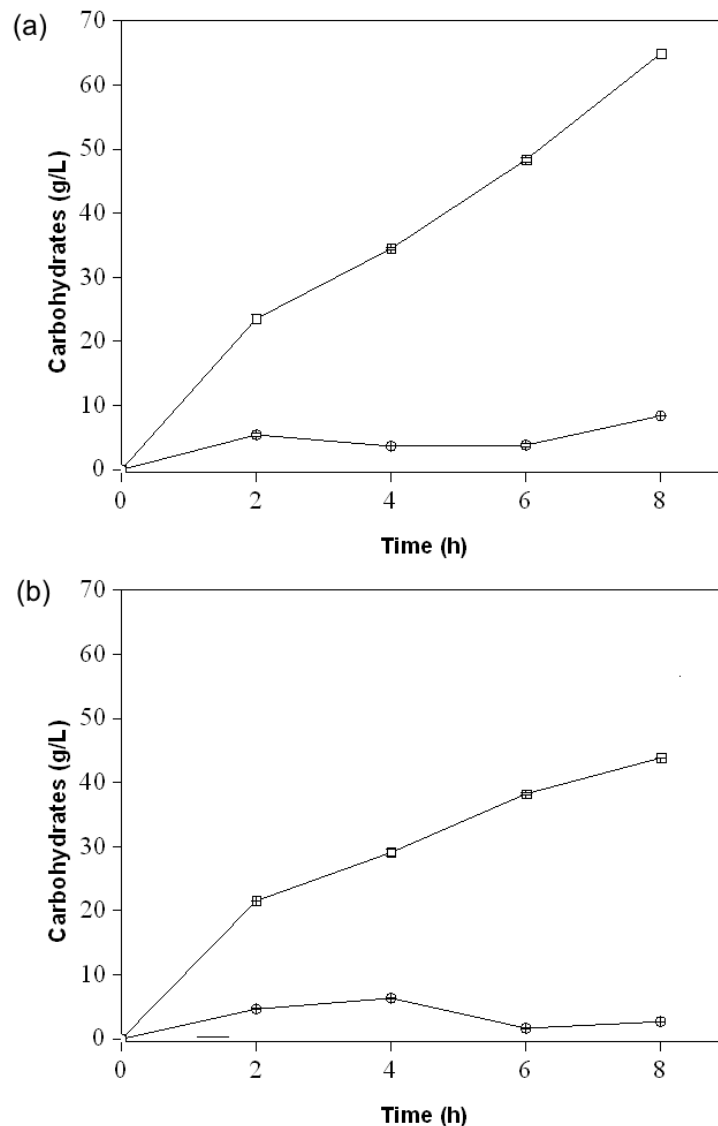


Figure 4 – Total IMO (□) and dextran (○) resulting from the synthesis with continued addition of sucrose (a) and combined addition of sucrose and maltose (b) by pulses in a stirred batch reactor (10 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase enzyme.

Oligosaccharides concentration increases along the time while dextran was low in both fed strategies. A slight increase in dextran formation is observed in essay 1, where only sucrose was fed. On the other hand, a slight decrease in dextran formation is observed in essay 2 where maltose was fed along sucrose, suggesting some hydrolyses.

The oligosaccharides amount is much higher in the synthesis where only sucrose was fed into the reactor (Fig 4a). The results confirms that the acceptor reaction suppress the dextran synthesis since dextran formation was very low when compared to the oligosaccharides (Rodrigues, Lona, & Franco, 2005). The second fed strategy, where sucrose and maltose, were added together into the reactor, suggests some substrate inhibition due to the lower amount of IMOs formed with low DP. The results also confirm that it is possible to elongate the oligosaccharide chain by adding sucrose into the reactor, which is in agreement to the acceptor reactor mechanism (Heincke, Demuth, Jördening, & Buchholz, 1999; Rodrigues, Lona, & Franco., 2005).

From the above results a third fed strategy was evaluated adding a mixture of sucrose and maltose for 6 hours followed by feeding only sucrose for more 6 hours. This strategy was done to favor the acceptor reaction keeping the panose at lower levels for further chain elongation by adding glucose moieties from sucrose. The results are presented in Fig.5. At the synthesis beginning, when sucrose and maltose were fed into the reactor, IMOs with DP from 3 to 5 were formed. On the other hand, at the end of the synthesis, after feeding only sucrose into the reactor, IMOs with DP from 3 to 9 were formed confirming the chain elongation by sucrose addition. (Fig.5a.). Fig 5b. shows that fructose was released along the synthesis and maltose was kept in excess. Sucrose and glucose were kept at very low levels, as expected.

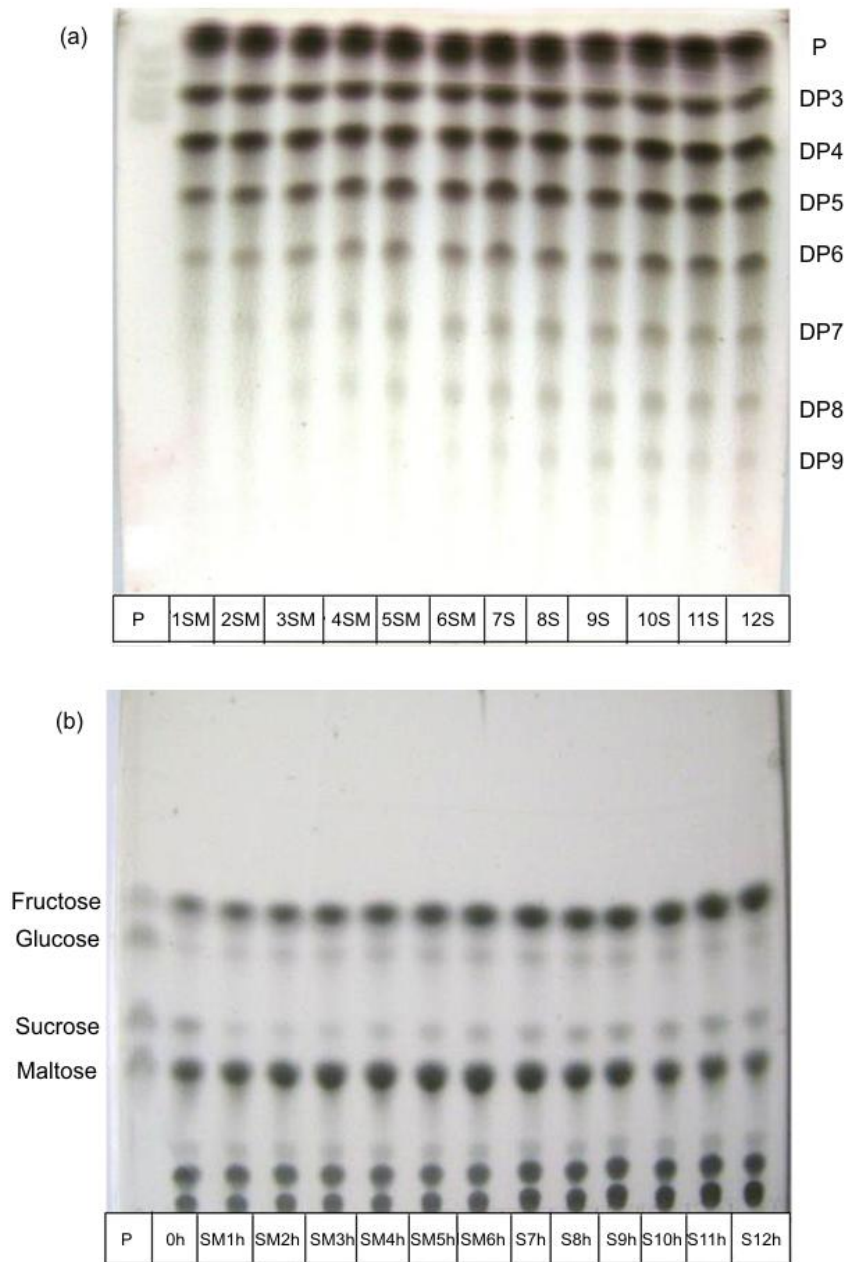


Figure 5. Thin layer chromatography of the IMOs (a) and mono- and disaccharides (b) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours (SM1h - SM6h) followed by addition of only sucrose as from seven hours (S7h - S12h) of synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase. P represents the pattern containing fructose, sucrose, maltose and glucose. DP represents the degree of polymerization of IMOs.

Fig. 6 presents the IMOs quantification by HPLC. According to the results, the third fed strategy favored the chain elongation. Besides the concentration, the IMOs variety (DP) also increased along the time. IMOs with DP up to 7 were formed in sufficient concentration that allowed its detection and quantification. Thus for chain elongation a sufficient amount of the precursor with lower DP in the homologous series is needed. For maltotetraose formation, a sufficient amount of panose is needed and so on. The chain elongation is observed from 4 hours of reaction when DP3 concentration decreased and DP6 and DP7 increases.

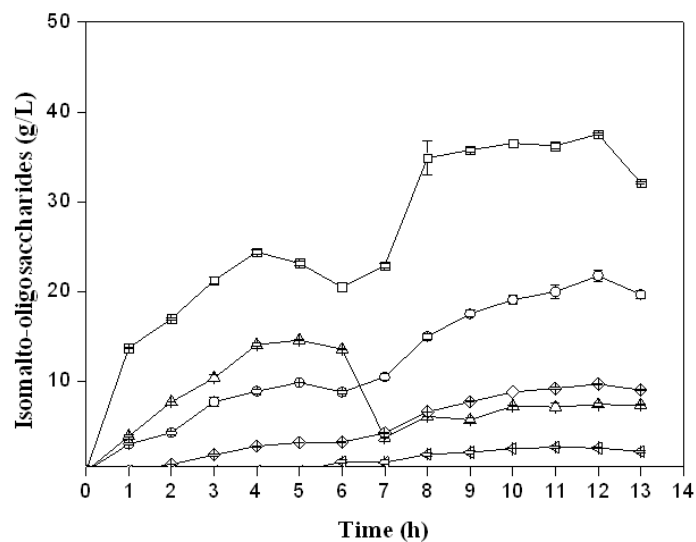


Figure 6. IMOs DP3(□), DP4 (○), DP5 (△), DP6 (◇) and DP7 (◁) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours followed by addition of only sucrose as from seven hours of synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase.

Prebiotic oligosaccharides must present DP from 3 to 10. The composition, the chain structure and the DP affects the intestinal fermentation and the short chain fat acid produced in the colon (Kleessen, Hartmann, & Blaut, 2001; Nilsson & Nyman, 2005). IMOs with DP 8 and 9 were not detected in HPLC because their concentration was below the detection limit.

Besides, there is no standard available with DP higher than 7. Figure 7 shows the total concentration of IMOs and the dextran formed along the synthesis. The third fed strategy favored the increase in IMOs concentration keeping dextran at low levels during all the synthesis because maltose and sucrose were available during the whole process.

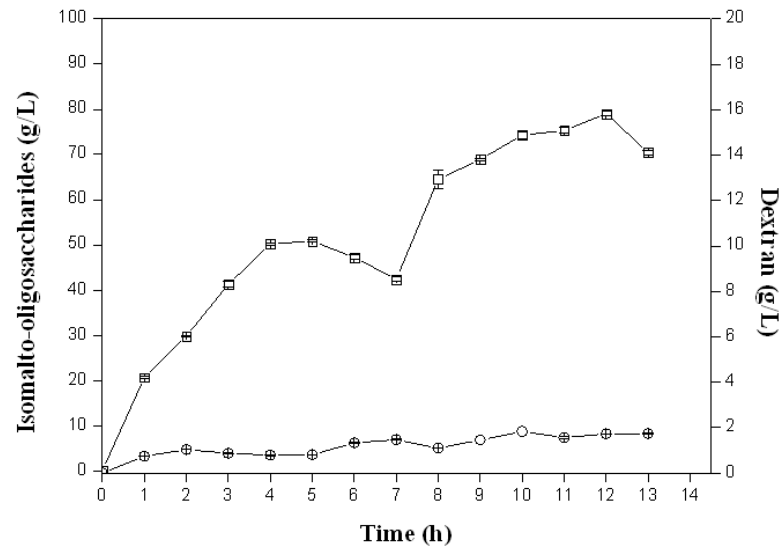


Figure 7. Total IMO_s (□) and dextran (○) from the synthesis with addition of sucrose and maltose mixture for six hours followed by addition of only sucrose as from the 7th hour of the synthesis by pulses. Synthesis was carried out in a stirred batch reactor (40 mL) thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1 UI / mL of dextransucrase.

When the synthesis was carried out without fed (Table 2), the best condition yielded 20.67 g/L of IMO_s with DP3 and DP4. When a mixture of sucrose and maltose was fed, followed by feeding only sucrose into the reactor, a higher amount of IMO_s was obtained (79.04 g/L) with DP from 3 to 9. Thus, the fed-batch reactor showed to be superior to the batch processing because not only the IMO_s yield was higher in this systems but it also allowed the chain elongation, which might improve the prebiotic characteristic of the product.

Figure 8 present the IMO_s distribution at the end of the synthesis carried out in fed-batch processing.

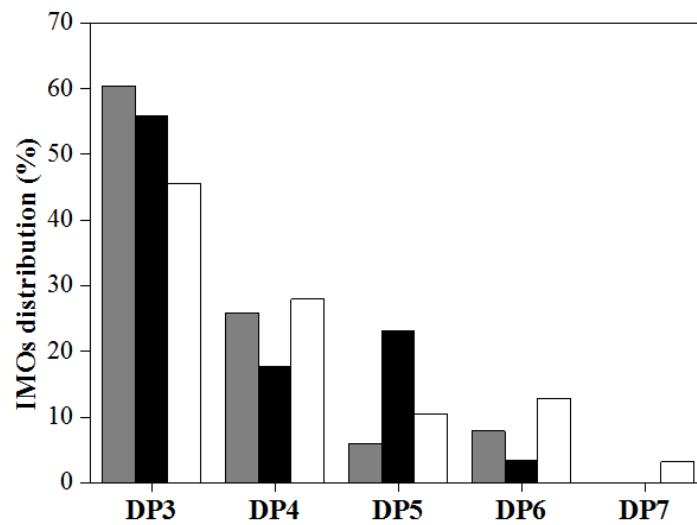


Figure 8. IMOs obtained at the end of synthesis carried out with three different fed strategies of sucrose and maltose to the reaction medium for synthesis of long chain IMOs: addition of only sucrose (■); addition of a mixture containing sucrose and maltose (■) and adding of a mixture containing sucrose and maltose followed by the addition of sucrose alone (□). Synthesis was carried out in stirred batch reactor with thermostated at 30°C and pH 5.2 containing 1UI / mL of dextransucrase.

According to the results presented herein, the IMOs DP depends on the fed strategy because their formation are related to the amount of sucrose, maltose and the precursor in the reaction system. When only sucrose was fed into the reactor, IMOs with DP3 and DP4 were formed in high amounts. Feeding sucrose and maltose the IMOs with DP3 and DP5 presented the higher percentage. When the substrate mixture (maltose and sucrose) was fed followed by sucrose addition, a higher amount and a better distribution in terms of DP was obtained: DP3 (45.9%); DP4 (27.94%), DP5 (10.48%), DP6 (12.85%) e DP7 (3.14%).

4. Conclusions

In the present study strategies for IMOs chain elongation were evaluated. Ratios of maltose/sucrose of 1.125 favored the IMOs suppressing the dextran synthesis showing that only a slight excess of the acceptor is needed to shift the enzyme pathway from dextran synthesis to the acceptor reaction. The fed-batch was superior to traditional batch processing applied to enzyme synthesis resulting in chain elongation and higher IMOs yields. Up to date, no such strategy was evaluated for IMOs synthesis.

The addition of a mixture of maltose and sucrose followed by sucrose feeding was the best fed strategy resulting in high IMOs formation (79.04 g/L) with a better DP variety (from DP3 to DP9). The process can be further optimized to increase the production and the concentration of IMOs with high DP.

Acknowledgments

The authors thank CAPES form the financial support and ARS Culture Collection for the strain *L.mesenteroides* B-512F.

References

- CHUNG, C.H.; DAY, D.F. (2004). Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry probiotic. *Poultry Science Association*, 83, 1302–1306.
- Chung, C. H. (2006). Production of glucooligosaccharides and mannitol from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 fermentation and its separation from byproducts. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 325-329.
- Debnam, E. S., Denholm, E. E., & Grimble, G. K. (1998). Acute and chronic exposure of rat intestinal mucosa to dextran promotes SGLTI-mediated glucose transport. *European Journal of Clinical Investigation*, 28, 651-658.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, P. A., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Gibson, G. R., Probert, H. M. Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275.
- Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., & Paquot, M. (2011). Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 394-409.

- Goffin, D., Wathelet, B., Blecker, C., Deroanne, C., Malmendier, Y., & Paquot, M. (2010). Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 4, 607-616.
- Guimarães, D. R. B., Costa, F. A. A., Rodrigues, M. I., & Maugeri, F. (1999). Optimization of dextran synthesis and acidic hidrolisys by surface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16, 129-139.
- Heincke, K., Demuth, B., Jördening, H. J., & Buchholz, K. (1999). Kinetics of the dextransucrase acceptor with maltose-experimental results and modeling. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 523–534.
- Honorato, T. L., Rabelo, M. C., Gonçalves, L. R. B., Pinto, G. A. S., & Rodrigues, S. (2007). Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1409–1415.
- Kaneko, T. T., Kohmoto, H., Kikuchi, M., Shiota, H., & Mitsuoka, T. (1994). Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal Bifidobacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 2288-2290.
- Kitaoka, M., & Robyt, J. F. (1999). Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC dextransucrase: kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentration. *Carbohydrate Reserach*, 32, 183-191.
- Kleessen, B., Hartmann, L., & Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, 86, 291–300.
- Lee, M. S., Cho, S. K., Eom, H. J., Kim, S. Y., Kim, T. J., & Han, N. S. (2008). Optimized substrate concentrations for production of long-chain isomaltooligosaccharides using dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1141-1145.

Lomax, A. R., & Calder, P. C. (2009). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of Nutrition*, *101*, 633-658.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*, 426-428.

Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, *68*, 587-597.

Nilsson, U., & Nyman, M. (2005). Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerisation and solubility. *British Journal of Nutrition*, *94*, 705–713.

Patel, S., & Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*, 1119–1128.

Qiang, X., YongLie, C., & QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *77*, 435–441.

Rabelo, M. C., Honorato, T. L., Gonçalves, L. R. B., Pinto, G. A., & Rodrigues, S. (2009). Optimization of enzymatic synthesis of isomalto-oligosaccharides production. *Journal of Food Biochemistry*, *33*, 342–354.

Rabelo, M. C., Honorato, T. L., Gonçalves, L. R. B., Pinto, G. A. S., & Rodrigues, S. (2006). Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *133*, 31-40.

Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*, 305–39.

Robyt, J. F. (2000). Thin-layer chromatography of carbohydrates. In I. D. Wilson, T. R. Adlard, C. F. Poole, & M. Cooke (Eds), *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 2235-2244). Boca Raton: Academic.

- Robyt, J. F., & Walseth, T. F. (1979). Production Purification and Properties of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F. *Carbohydrate Research*, 68, 95-111.
- Robyt, J. F., & Walseth, T. F. (1978). The Mechanism of Acceptor Reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B- 512F Dextranucrase. *Carbohydrate Research*, 61, 433-445.
- Rodrigues, S., Lona, L. M. F., & Franco, T. T. (2006). Optimizing panose production by modeling and simulation using factorial design and surface response analysis. *Journal of Food Engineering*, 75, 433–440.
- Rodrigues, S., Lona, L. M. F., & Franco, T. T. (2005). The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 28, 9–14.
- Seifert, S., & Watzl, B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *Journal of Nutrition*, 137, 2563-2567.
- Silva, I. M., Rabelo, M. C., & Rodrigues, S. (2012). Cashew juice containing prebiotic oligosaccharides. *Journal of Food Science Technology*, doi: 10.1007/s13197-012-0689-9.
- Torres, D. P. M., Goncalves, M. D. F., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 438-454.
- Vergara, C. M. A., Honorato, T. L., Maia, G. A., & Rodrigues, S. (2010). Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 141–145.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food- related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 328-335.
- Zhang, L., Su, Y., Zheng, Y., Jiang, Z., Shi, J., Zhu, Y., & Jiang, Y. (2010). Sandwich- structured enzyme membrane reactor for efficient conversion of maltose into isomaltooligosaccharides. *Bioresource Technology*, 101, 9144-9149.

Chromatographic separation of isomaltooligosaccharides on ion-exchange resins: the effect of the cationic form

M. C. Rabelo¹; C. S. M. Pereira²; S. Rodrigues³; A. E. Rodrigues²; D. C. S. Azevedo^{1*} (1) *Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do PICI, Fortaleza, Brasil.* (2) *LSRE - Laboratory of Separation and Reaction Engineering - Associate Laboratory LSRE/LCM, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal.* (3) *Department of Food Engineering, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Brazil.*

ABSTRACT – Prebiotic isomaltooligosaccharides (IMOs) are composed of α -D-glucose units linked by glucosidic α (1 \rightarrow 6) bonds and they are able to reach large bowels intact, where they are metabolized by bifidobacteria and lactobacillus. They may be obtained by enzymatic synthesis. Reaction media is composed of monosaccharides (glucose and fructose), disaccharides (sucrose and maltose), isomaltooligosaccharides (the product of interest) and dextrans. Dextrans are readily separated by solvent precipitation, however continuous chromatographic separation (SMB) should be an interesting option for IMOs enrichment and purification from mono and disaccharides. The objective of the present work was to measure fundamental adsorption data of IMOs, mono and disaccharides in preparative columns packed with ion-exchange resin of different cationic forms (K^+ , Ca^+ , H^+ and Na^+), so as to verify the influence of the cation on the selectivity and capacity. Ion-exchange in H^+ form showed the best performance in terms of selectivity between maltose and maltotriose, but the resin in the K^+ form had superior adsorption capacities. Also on the basis of equilibrium theory, optimal SMB operating conditions for resin H^+ will yield the highest productivity as compared to the other cationic forms.

1. INTRODUCTION

Prebiotic supplements are food ingredients which act on the composition and activity of gastrointestinal microbiota, with evident health benefits (Gibson *et al.* 2010, Roberfroid *et al.* 2010). Amongst prebiotic oligosaccharides, isomaltooligosaccharides have gained increased interest due to the many biological roles as: promoters of the growth of bifidobacteria in large intestines of animals and human beings, decreased cariogenic effect and its potential to activate the immune system and decrease lipidic metabolism, with benefits

* Author to whom all correspondence should be addressed. E-mail: diana@gpsa.ufc.br

to liver and kidney functions (Li *et al.* 2009, Mizubuchi *et al.* 2005, Lin *et al.* 2011, Rycroft *et al.* 2001).

Isomaltooligosaccharides are composed of monomers of glucose held together by $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosidic bonds with degree of polymerization varying from 2 to 6 (Chung 2006, Rastall 2010). They may be obtained from enzymatic processes by transglucosidation of another polysaccharide (amilose, sucrose and amilopectins) using enzyme dextran-sucrase. In media containing sucrose as the only substrate, this enzyme catalyses the formation of dextran. Nevertheless, if there is an acceptor (maltose, fructose, glucose, etc.) as the predominant substrate, and sucrose as the secondary substrate, the enzyme produces prebiotic oligosaccharides (Heincke *et al.* 1999, Rabelo *et al.* 2006, Rodrigues *et al.* 2005). In the enzymatic synthesis media, besides the IMOs as reaction products, there are glucose, maltose (non-consumed substrates) and fructose (a byproduct from sucrose hydrolysis). These mono and disaccharides must be separated from IMOs, since they have no prebiotic properties (Gramblicka and Polakovic 2007, Kuhn *et al.* 2012).

Simulated moving bed (SMB) has been recognized as an efficient continuous chromatography-based technology for the separation of sugar mixtures, particularly because it can perform successful separation for low separation factors using fairly efficient columns (hundreds or even tenths of theoretical plates). SMB has been frequently reported for fructose/glucose, monosaccharide/disaccharide and many other ternary and quaternary separations of hydrolysis byproducts (Gramblicka and Polakovic 2007, Bubnik *et al.* 2004, Kim *et al.* 1992; Geisser *et al.* 2005). Nevertheless, to the knowledge of these authors, it has not yet been proposed for isomaltooligosaccharide purification from enzymatic synthesis reaction media.

The key to the design and optimization of SMB units relies on the accurate determination of adsorption isotherms of the components of the mixture to be separated on the stationary phase packing the columns. For linear adsorption equilibrium, which is generally the case of saccharides on ion-exchange resins, fundamental equilibrium and mass transport experiments are usually conducted in SMB individual preparative columns by applying concentration steps or injecting pulses of either a tracer or the adsorbates of the mixture (Ramos *et al.* 2011, Azevedo and Rodrigues 2006, Chilamkurthi *et al.* 2012).

Sulphonated polymers, usually a copolymer of divinylbenzene and styrene, are commonly used as ion-exchange resins in sugar separations (Luz *et al.* 2008, Vente *et al.*

2005b). Adsorption equilibrium data have been reported for glucose, fructose, arabinose, xylose, sucrose and some oligosaccharides in strongly acidic cation-exchange resins in forms K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , H^+ or Fe^{2+} (Pedruzzi *et al.* 2008, Gramblicka and Polakovic 2007, Nobre *et al.* 2009, Lei *et al.* 2009).

Hence, the objective of the present work was to investigate the effect of the cationic form (K^+ , Ca^+ , H^+ and Na^+) of a divinylbenzene-styrene ion-exchange resin on the separation of isomaltooligosaccharides by preparative pulse chromatography experiments.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Column packing with ion exchange resins

The strongly acidic gel type resin Dowex 50WX4-400 (4% crosslinking) was supplied by Sigma-Aldrich, with particle diameter in the range of 37-74 μm and in H^+ form. Four jacketed preparative columns Superformance 150-26 (Gotec Labor Technik, Muhlthal) with adjustable length (max. 150 mm) and internal diameter of 26 mm were packed with Dowex resin in H^+ form by pouring a slurry of the resin in water and pumping water for 1 hour against a backpressure regulator to make sure the resin settles down and is packed homogeneously. For three of the columns, cation exchange to forms K^+ , Ca^{2+} and Na^+ was carried out using aqueous solutions of potassium sulfate (K_2SO_4) 0,5N; calcium sulfate ($CaSO_4$) 1N and sodium chloride ($NaCl$) 1N, respectively. These resins were pumped through the columns by means of a peristaltic pump at the flow rate of 5mL/min. Ion exchange was monitored by pH measurements and pumping of salt solutions would stop when the pH of the exit solution was equal to that of the feed. After the cation-exchange step, the columns were rinsed with deionized water to ensure excess cations present on bulk liquid phase would be washed away.

2.2 Characterization of Columns by Tracer Pulse Experiments

The method of statistical moments was applied to tracer pulse experiments performed in the four columns so as to determine the bed porosity and number of theoretical plates (on the basis of axial dispersion and packing heterogeneities). Blue dextran in solution (5 g/L)

was used as a tracer. 20 μL samples were injected under different flow rates and the response at the exit was followed by a UV-detector at 300 nm. The bed porosity was determined from the peak retention time, as indicated by the first moment, according to Eqn 1 (Schmidt-Traub, 2005):

$$\frac{\int_0^{\infty} C(t)t dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} = \bar{t} = \frac{\varepsilon V_c}{Q} \quad (1)$$

where $C(t)$ is the tracer concentration at the exit of the column, ε is the bed porosity, \bar{t} is the space time, Q is the flow rate and V_c is the column volume.

HETP (height equivalent to a theoretical plate) was determined from the first and second statistical moments, as in Eqns (2-3) (Schmidt-Traub, 2005):

$$\text{HETP} = \frac{L}{N_p} = \frac{\sigma^2}{\bar{t}^2} L \quad (2)$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} C(t)[t - \bar{t}]^2 dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (3)$$

where L is the column length, N_p is the number of theoretical plates in the column and σ^2 is the peak variance.

2.3 Determination of adsorption isotherms of isomaltooligosaccharides

The adsorbates considered in this study were fructose, glucose, maltose and prebiotic isomaltooligosaccharides with degree of polymerization from 3 to 7. In order to measure the adsorption isotherm of each sugar in each column of a given cationic form, pulse experiments were performed. Standard solutions were prepared in the following concentration ranges: maltotriose (12 to 50 g/L), maltotetraose (8 to 50 g/L), maltopentaose (8 to 40 g/L), maltohexaose (4 to 50g/L) and maltoheptaose (3 to 50 g/L). These are prebiotic maltooligosaccharides with degree of polymerization (DP) 3, 4, 5, 6 and 7, respectively. Apart from these, the following sugars were studied: fructose (15 to 50 g/L), glucose (11 to 31 g/L) and maltose (10 to 70 g/L). The choice of saccharides and their concentration range was based

on the products and reagents concentration at the end of a typical enzymatic synthesis. Pulses of 100 μL of each one of the prepared solutions were injected under a flowrate of 5 mL/min. The concentration at the exit of the column was monitored by a UV/Vis detector. Studies reported by several authors (Altenhöner *et al.* 1997; Lee and Lee 1992; Viard and Lameloise 1992) show that adsorption isotherms of sugars in ion exchange resins are linear over a wide concentration range (usually up to 100 g/l). Because all saccharides present in IMOs enzymatic syntheses are within this concentration range, adsorption isotherms to be measured were expected to be linear.

The adsorption constant (K) of the linear isotherm was calculated from the residence time (t_r) of the chromatographic peak of an injected species in the column, as given in eqn (4). The residence time it may be mathematically calculated from the ratio of integrals (first statistical moment) shown in equation (1). The adsorbed phase concentration (q_0) in equilibrium with a given liquid phase concentration (C_0) injected into the column is then given by eqn (5). It is also possible to calculate the selectivity of any two sugars i and j (α_{ij}) as the ratio between their adsorption constants. This parameter will be used to compare resins of different cationic forms and their potential ability to separate prebiotic IMOs from non-prebiotic saccharides.

$$t_r = \frac{\varepsilon V_c}{Q} \left[1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} K \right] \quad (4)$$

$$q_0 = KC_0 \quad (5)$$

2.4 Definition of separation operating conditions of a simulated moving bed according to the equilibrium model

With the aid of the adsorption isotherms of the various saccharides found for each of the cation-exchange columns, it was possible to identify the window of operating conditions that allowed complete separation of prebiotic IMOs from non-prebiotic sugars. This window is delimited by constraints imposed on the velocity ratios (γ_i) between mobile (liquid) and stationary (solid) phases in the different zones, considering the equivalent representation of a true moving bed. These constraints are given in eqns (6-8):

$$\gamma_1 > \nu K_A \quad (6)$$

$$\nu K_B < \gamma_2 < \gamma_3 < \nu K_A \quad (7)$$

$$\gamma_4 < \nu K_B \quad (8)$$

The definition of the design parameter γ_j is based on the concept of true moving bed (TMB). It is the ratio between the fluid phase velocity U_{Fj} and the solid phase velocity U_S in a given section j of a TMB. Subscript A refers to the strongest adsorbed component and B refers to the least adsorbed for a binary separation. The parameter ν is the solid/liquid phase ratio ($1/\varepsilon - 1$). In case of a multicomponent mixture, as the present case of IMO purification, provided the adsorption affinity is directly or inversely proportional to the saccharide molar mass, A and B would be two consecutive saccharides, so that the product extract would contain all non-prebiotic sugars and the raffinate would contain the IMOs or vice-versa. In terms of a bidimensional window of separation, the restriction given by eqn (7) means that the conditions of separation in terms of velocity ratios in sections 2 and 3 will lie within a straight triangle, defined by the diagonal $\gamma_2 = \gamma_3$ and the area encompassed above it by lines $\gamma_2 = \nu K_B$ and $\gamma_3 = \nu K_B$. Any point within this separation region, and also those in accordance with eqns (6) and (8) may be converted into SMB flowrates and switching time, according to eqn (9). If non-ideality effects are not significant, that is, if columns have a sufficiently low HETP, complete separation should be achieved.

$$\gamma_j = \left. \frac{U_{Fj}}{U_S} \right|^{TMB} = \left. \frac{Q_j t^*}{\varepsilon V_c} \right|^{SMB} - 1 \quad (9)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of Semipreparative Columns

Table 1 summarizes the bed porosity (ε), capacity ratio (ν) and number of theoretical plates (N_p) for the studied columns in each of the four cationic forms (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e H^+) of ion-exchange resin Dowex 50WX4. They were determined by applying the moments analysis to tracer pulse experiments (eqns 1-3) and reported values represent averages from those obtained under three different flow rates. Observed porosities are relatively low, which is indicative of tight packing of particles of such small sizes (37-74 μm). These values are in accordance with those reported by Vente *et al.* (2005a), who also studied this ion-exchange resin for the separation of other sugars. Cation-exchange of the pristine H^+ resin tended to

slightly increase porosity after all three cation exchanges, as a consequence of resin contraction or swelling, which required length adjustment by moving the piston. Nevertheless, all tracer peaks (not shown) were nearly symmetrical, which indicates that packing is homogeneous. Except for the column in K^+ form, the other columns had a reasonable number of theoretical plates, considering that no special care was taken in packing them. According to Charton and Nicoud (1995), columns with a relatively low number of theoretical plates may be used in SMB units and operating conditions may be safely chosen from the equilibrium theory.

Table 1. Summary of bed porosities, phase ratios and number of theoretical plates of the ion-exchange columns in four cationic forms

Ionic form	Bed porosity (ϵ)	Phase ratio (v)	HETP	Number of plates (N_p)[†]
Ca^{2+}	0.284	2.52	0.22	54
K^+	0.276	2.62	0.27	33
Na^+	0.248	3.03	0.12	72
H^+	0.242	3.13	0.14	77

[†] $N_p = L/HETP$, as in eqn. (2)

3.2 Adsorption isotherms of maltooligosaccharides and other mono and disaccharides

By applying eqns (1), (4) and (5) to pulse experiments with all studied saccharides, adsorption isotherms were measured in a concentration range up to 70 g/L in the case of fructose and maltose. For each injected saccharide, the retention time of the corresponding chromatographic peak was calculated from the first statistical moment, as in eqn (1). Then, the adsorption constant was calculated from equation (4) and q_0 was obtained from eqn (5). In Figures 1 to 4, the isotherms of glucose, fructose, maltose and prebiotic IMO up to DP = 7 are shown for the ion-exchange columns in the four cationic forms under study 25 °C.

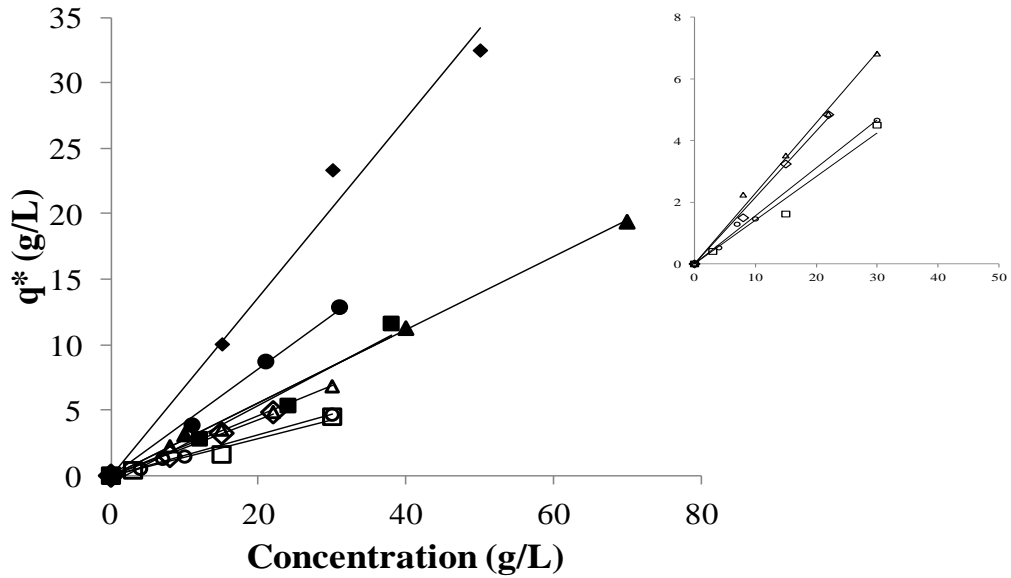


Figure 1. Adsorption equilibrium isotherms of maltose (▲), fructose (◆), glucose (●), maltotriose (DP3) (■), maltotetraose (DP4) (Δ), maltopentaose (DP5) (◇), maltohexaose (DP6) (○) and maltoheptaose (DP7) (□) on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in Ca^{2+} form at 25°C.

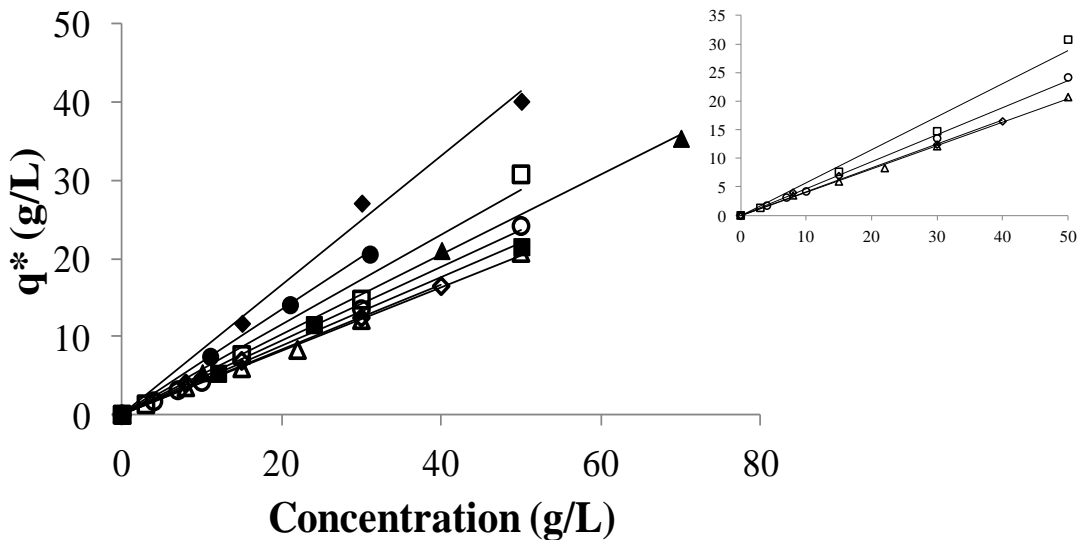


Figure 2. Adsorption equilibrium isotherms of maltose (▲), fructose (◆), glucose (●), maltotriose (DP3) (■), maltotetraose (DP4) (Δ), maltopentaose (DP5) (◇), maltohexaose (DP6) (○) and maltoheptaose (DP7) (□) on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in K^{+} form at 25°C.

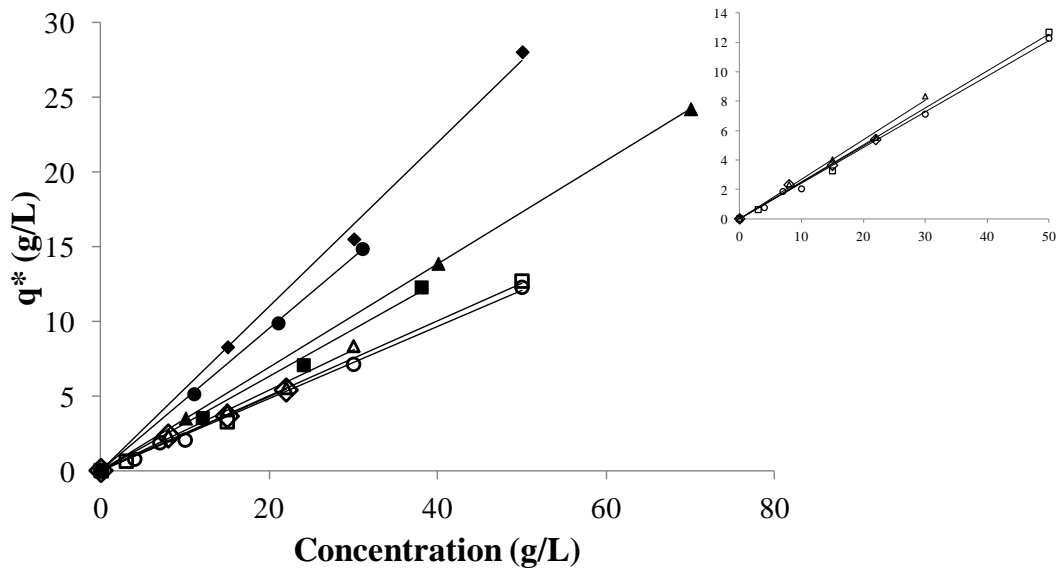


Figure 3. Adsorption equilibrium isotherms of maltose (▲), fructose (◆), glucose (●), maltotriose (DP3) (■), maltotetraose (DP4) (Δ), maltopentaose (DP5) (◇), maltohexaose (DP6) (○) and maltoheptaose (DP7) (□) on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in Na⁺ form at 25°C.

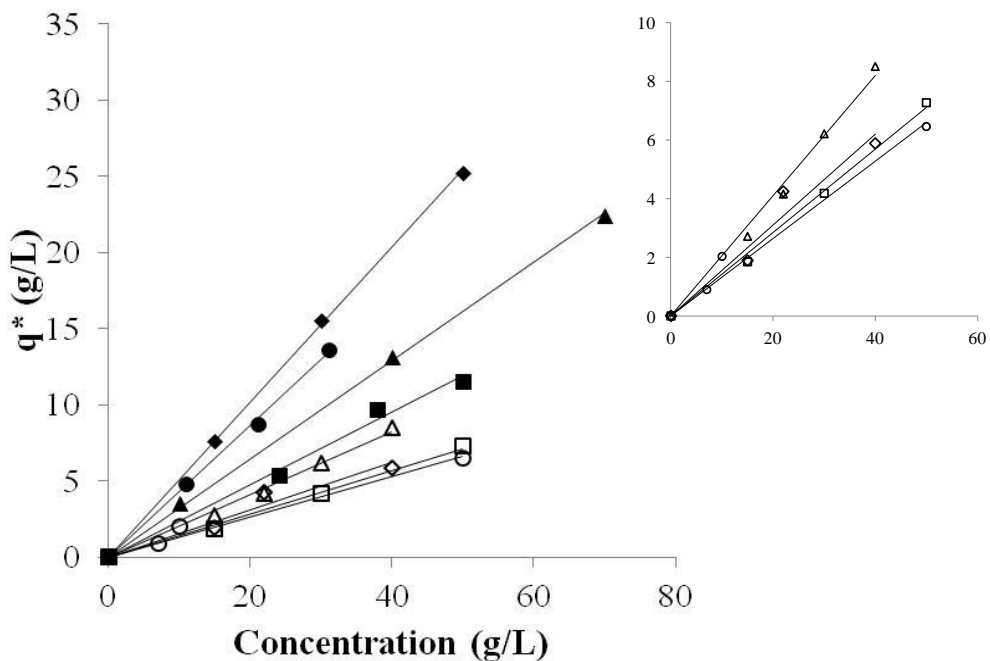


Figure 4. Adsorption equilibrium isotherms of maltose (▲), fructose (◆), glucose (●), maltotriose (DP3) (■), maltotetraose (DP4) (Δ), maltopentaose (DP5) (◇), maltohexaose (DP6) (○) and maltoheptaose (DP7) (□) on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in H⁺ form at 25°C.

For all saccharides in all resins, isotherms are linear in this concentration range, as expected. As a general trend, there is also the same order of adsorption affinity for the four cationic forms. In decreasing order, the four cation-exchange resins adsorb fructose > glucose > maltose > maltotriose (DP3) > maltotetraose (DP4) > maltopentaose (DP5) > maltohexaose (DP6) > maltoheptaose (DP7), except for the K⁺ resin. For the latter the adsorption constants of DP6 and DP7 are higher than the other IMO of lower polymerization degrees. The decreasing affinity with increasing molar mass observed for the other three resins may be due to exclusion effects or the retention of lesser amounts of larger adsorbates due to reduced pore space in the resin. Vente *et al.* (2005a) and Vaňková *et al.* (2010) also reported the same behavior in separation studies of sugars of different molar masses in ion exchange resins. Nevertheless, it is clear that the type of cation also plays a role, either restricting adsorption sites due to its size or interacting with hydroxyl and carbonyl (in the case of fructose) groups present in the saccharides (Nobre *et al.* 2009).

Table 2 summarizes the adsorption constants (*K*) for all studied saccharides in the four cation-exchange columns. As a general rule, adsorption capacities are larger for the K⁺ form, followed by Ca²⁺, Na⁺ and H⁺. A high capacity for the Ca²⁺ cation is to be expected on the basis of larger available porous volume, since one divalent cation would compensate for two monovalent cations. On the other hand, for the monovalent cations, adsorption affinities increase inversely with respect to the cation size (H⁺ < Na⁺ < K⁺), which outrules steric effects. The explanation for the higher capacity of K⁺ probably lies on the stronger electrostatic interactions with free electrons from the oxygen atoms present in the saccharides. According to Chilamkurthi *et al.* (2012), the fact that the potassium cation is larger than calcium and sodium also favors the formation of more stable complexes with the sugars, particularly monosaccharides.

Table 2 also includes the selectivity between maltose and maltotriose as the ratio of their adsorption constants for each studied resin. If a simulated moving bed is to be used to separate prebiotic from non-prebiotic saccharides, this parameter is more important than the adsorption capacity itself. Although, the resin in K⁺ form has significantly higher capacities than the others, the largest selectivity is found for cation H⁺. A direct consequence of this is that higher throughputs may be processed in a SMB unit. Moreover, for the K⁺ resin, the adsorption constant of DP7, and not DP3, is the highest for all IMOs, but it is still lower than the adsorption constant of maltose. Therefore, a more suitable definition of selectivity should

be to consider the ratios between the adsorption constants of maltose and DP7. This figure is shown in parenthesis in Table 2.

Table 2. Adsorption constants and selectivity Maltose/maltotriose for resin Dowex 50WX4 at 25°C in the four studied cationic forms. The figures in parenthesis in K⁺ column were calculated taking DP7 (not DP3) into account. The figures in square brackets in Ca²⁺ and Na⁺ columns were calculated taking DP4 (not DP3) into account.

Equilibrium constant (<i>K</i>)	Cationic form			
	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺	H ⁺
Fructose	0.68	0.83	0.55	0.51
Glucose	0.41	0.67	0.48	0.43
Maltose	0.28	0.51	0.35	0.32
DP3	0.28	0.44	0.31	0.24
DP4	0.23	0.41	0.27	0.20
DP5	0.22	0.42	0.25	0.15
DP6	0.15	0.47	0.24	0.13
DP7	0.14	0.49	0.25	0.14
	[1.21]	(1.04)	[1.30]	
$\alpha_{\text{Maltose/DP3}}$	1.00	1.16	1.13	1.33
	[0.05]	(0.02)	[0.08]	
$K_{\text{DP3}(\alpha-1)}$	0	0.07	0.04	0.08

From the adsorption constants and selectivity values reported in Table 2, it can be concluded that all resins – except that in Ca²⁺ form – could be used in a simulated moving bed unit so as to concentrate all prebiotic IMO in the raffinate product (less adsorbed species) and all other non-prebiotic saccharides in the extract product (more retained species). The design of adequate SMB operating conditions could be carried out on the basis of the equilibrium theory, according to the velocity ratio restrictions given in eqns (6-8), taking maltose as the “A” species and maltotriose (DP3) as the “B” species. Bearing this in mind, the region of complete separation in terms of velocity ratios in zones 2 and 3 could be plotted and compared for the three resins.

These regions, as given by the equilibrium theory, are shown in Figure 5. There is no separation region for the resin in Ca²⁺ form because the selectivity between maltose and maltotriose is equal to one. One should note that, for the K⁺ resin, this reasoning would lead

to contamination of DP6 and DP7 in the extract stream, since their adsorption constants are higher than that of DP3. The vertex of each of the triangles indicates the optimal condition under which complete separation is still possible (neglecting mass transfer effects). In the case of the three resins under study, that in cationic form H^+ presents the larger distance between the vertex and the diagonal $\gamma_2 = \gamma_3$. In fact, from eqn (9), it follows that:

$$\gamma_3 - \gamma_2 = \frac{Q_{FEED} t^*}{\varepsilon V_C} = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} (K_{maltose} - K_{DP3}) \quad (10)$$

$$\frac{Q_{FEED} t^*}{V_C} = (1 - \varepsilon) K_{DP3} (\alpha - 1) \quad (11)$$

Productivity of a given separation mixture may be defined as the mass of IMO recovered in the raffinate stream per unit volume of ion-exchange resin per unit time. In a condition of complete separation, all fed IMOs is recovered in the raffinate and hence,

$$productivity = \frac{Q_{FEED} C_0}{n(1 - \varepsilon) V_C} = \frac{C_0 K_{DP3} (\alpha - 1)}{n \times t^*} = \frac{C_0 K_{DP3} (\alpha - 1)}{t_{cycle}} \quad (12)$$

where C_0 is the total concentration of IMOs present in the feed mixture and t_{cycle} is the total time of a complete cycle in a SMB unit. Hence, the amount $K_{DP3}(\alpha-1)$ allows us to compare the three resins in terms of productivity for the same unit, C_0 and cycle time. These values are reported in the last line of Table 2. The same type of analysis can be done considering DP4, and not DP3, as the strongest adsorbed to be completely collected in the raffinate stream. For resins in Na^+ and Ca^{2+} forms, the selectivity $\alpha_{Maltose/DP4}$ and $K_{DP4}(\alpha-1)$ are shown in square brackets. Better values are obtained as compared to the previous case (taking DP3 as reference), and these resins may also be adequate for IMOs separation if low recoveries of DP3 in the raffinate (that is, extract contaminated with DP3) can be tolerated.

In short, it is clear that the resin in H^+ form not only allows for a higher feed flow rate, but also to a higher productivity. Additionally, this former resin has twice as many theoretical plates as the latter, which leads to the conclusion that cationic form H^+ has superior characteristics for chromatographic continuous separation than K^+ , Na^+ and Ca^{2+} if one is interested in complete separation of prebiotic saccharides from non-prebiotic ones.

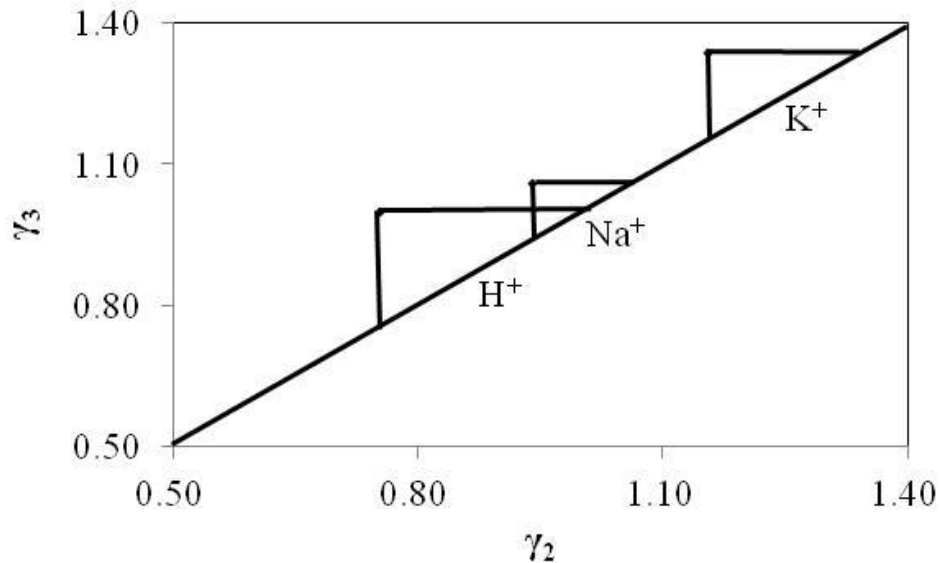


Figure 5. Region of complete separation of a simulated moving bed, according to the equilibrium theory, on ion-exchange resin Dowex 50WX4 in K^+ , Na^+ and H^+ forms. Parameters γ_2 and γ_3 are fluid-solid velocity ratios in sections 2 and 3 of an equivalent true moving bed (see equation 9). Complete separation is defined as the collection of 100% pure prebiotic isomaltooligosaccharides in the raffinate product and 100% pure mono and disaccharides in the extract product.

4. CONCLUSIONS

Ion-exchange resin Dowex 50WX4 in cationic forms Ca^{2+} , K^+ , Na^+ and H^+ was studied by elution chromatography experiments to investigate the effect of the cation on the adsorption capacity and potential to separate prebiotic isomaltooligosaccharides from other saccharides usually present in enzymatic synthesis. All resins adsorb preferentially monosaccharides, followed by disaccharides and IMOs with increasing degree of polymerization, which suits them for continuous chromatographic separation (e.g. simulated moving bed) of prebiotic sugars (degree of polymerization higher than three) from non-prebiotic ones. The resin in K^+ exhibits the highest adsorption constants, but also the highest HETP of all columns. Additionally, unlike the other resins, the adsorption constants of IMOs do not decrease monotonically with the degree of polymerization and the separation region required for a complete separation of prebiotic from non-prebiotic saccharides would be very limited. The resin in Ca^{2+} form has poor selectivity for IMOs, despite the relatively high

capacity for sugars, particularly monosaccharides. It may be an adequate option, however, if low recovery of DP3 in the raffinate stream may be tolerated. The pristine resin in H^+ had the lowest adsorption capacities; yet, the highest selectivity between maltose and maltotriose was observed together with the largest number of theoretical plates. With these features, it can be concluded that resin H^+ could be used as stationary phase of simulated moving bed units, allowing for the separation of prebiotic IMO's with the lowest dilution and highest productivity, as compared to the other cationic forms under study. It should be noted, however, that these conclusions are stated on the grounds of the equilibrium theory, i.e., in the absence of significant mass transfer resistances and hydrodynamic dispersive effects. This is likely to be the case for the H^+ column, given its low HETP and relatively weak adsorption affinity.

NOMENCLATURE

C_0	fluid phase concentration, $g L^{-1}$
$C(t)$	tracer concentration at the exit of the column, $g L^{-1}$
HETP	height equivalent to a theoretical plate, cm
K	linear adsorption constant, dimensionless
L	column length, cm
N_p	number of theoretical plates in the column
q_0	equilibrium adsorbed phase concentration, $g L^{-1}$
Q	fluid flow rate, $mL min^{-1}$
\bar{t}	space time, min
t^*	switch time, s
t_{cycle}	total time of a complete cycle in a SMB unit, s
t_r	residence time of the chromatographic peak, s
V_c	column volume, m^3
U_{Fj}	fluid phase velocity, $m s^{-1}$
U_S	solid phase velocity, $m s^{-1}$

Greek Letters

α	selectivity, dimensionless
γ_j	ratio between liquid and solid interstitial velocities in a TMB section j, dimensionless
ε	bed porosity, dimensionless
ν	solid/fluid phase ratio ($1/\varepsilon - 1$), dimensionless
σ^2	peak variance

Subscripts

A	strongest adsorbed component for a binary separation
B	refers to the least adsorbed for a binary separation
i	chemical species
j	TMB/SMB section

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CAPES (process 294/11) and FCT (process: 1463/11-0) for funding a grant to M.R. Rabelo, particularly during her stay in LSRE, University of Porto (Portugal), where the experimental work was carried out.

REFERENCES

- Altenhöner U, Meurer M., Strube J. and Schmidt-traub H. (1997) *Journal of Chromatography A* **769**, 59.
- Azevedo D.C.S. and Rodrigues A.E. (2006) *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **23**, 171.
- Bubnik Z., Pour Z., Gruberova A., Starhova H., Hlinkova A. and Kadlec P. (2004) *Journal Food Engineering* **61**, 509.
- Charton F. and Nicoud R.M. (1995) *Journal of Chromatography A*, **702**, 97.
- Chilamkurthi S, Willemsen J.H, van der Wielen L.A, Poiesz E. and Ottens M. (2012) *Journal of Chromatography A* **1239**, 22.
- Chung C.H. (2006) *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 325.

- Geisser A., Heindrich T., Boehm G. and Stahl B. (2005) *Journal Chromatography A* **1092**, 17.
- Gibson G.R., Scott K. P., Rastall R.A., Tuohy K.M., Hotchkiss A., Dubert-Ferrandon A., Gareau M., Murphy E.F., Saulnier D., Loh G., Macfarlane S., Delzenne N., Ringel Y., Kozianowski G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop I., Walker C. and Buddington, R. (2010) *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* **7**, 1.
- Gramblicka M. and Polakovic M., (2007) *Journal of Chemical Engineering Data* **52**, 345.
- Heincke K., Demuth B., Jördening H. J. and Buchholz K. (1999) *Enzyme and Microbial Technology* **24**, 523.
- Kim K. B., Kishihara S. and Fujii S. (1992) *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **56**, 801.
- Kuhn R.C., Mazutti M.A. and Filho F.M. (2012) *LWT - Food Science and Technology* **48**, 127.
- Lee K. N. and Lee W. K. (1992) *Separation. Science & Technololy* **27**, 295.
- Lei H., Bao Z., Xing H., Yang Y., Ren Q., Zhao M. and Huang H. (2009) *Journal of Chemical & Engineering Data* **55**, 735.
- Li J., Tan B. and Mai K. (2009) *Aquaculture* **291**, 35.
- Lin, Q., Xiao, H., Zhao, J., Li, L., Yu, F., Liu, X. and Cheng, X. (2011) *International Journal of Food Science and Technology* **46**, 1194.
- Luz D.A., Rodrigues A.K.O., Silva F.R.C., Torres A.E.B., Cavalcante C.L., Brito E.S. and Azevedo D.C.S. (2008) *Bioresource Technology* **99**, 2455.
- Mizubuchi H., Yajima T., Aoi N., Tomita T. and Yoshikai, Y. (2005) *Journal of Nutrition* **135**, 2857.
- Nobre C., Santos M.J., Dominguez A., Torres D., Rocha O., Peres A.M., Rocha I., Ferreira E.C., Teixeira J.A. and Rodrigues L.R. (2009) *Analytica Chimica Acta* **654**, 71.
- Pedruzzi I., Borges da Silva E.A. and Rodrigues A.E. (2008) *Separation and Purification Technology* **63**, 600.
- Rabelo M.C., Honorato T.L., Gonçalves L.R.B., Pinto G.A.S. and Rodrigues S. (2006) *Applied Biochemistry and Biotechnology* **133**, 31.
- Ramos J.E.T., Duarte T.C., Rodrigues A.K.O., Silva Jr I.J., Cavalcante Jr C.L. and Azevedo D.C.S. (2011) *Journal of Food Engineering* **102**, 355.
- Rastall R.A. (2010) *Annual Review of Food Science and Technology* **1**, 305.

- Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., Léotoing L., Wittrant Y., Delzenne N., Cani P.D., Neyrinck A.M. and Meheust A. (2010) *British journal of Nutrition* **104**, 1.
- Rodrigues S., Lona L.M.F. and Franco T.T. (2005) *Bioprocess Biosystems Engineering* **28**, 9.
- Rycroft C.E., Jones M.R., Gibson G.R. and Rastall, R.A. (2001) *Journal of Applied Microbiology* **91**, 878.
- Schmidt-Traub, H. Preparative Chromatography: of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents, Germany, Wiley Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2005.
- Vaňková K., Gramblička M. and Polakovic M. (2010) *Journal of Chemical & Engineering Data* **55**, 405.
- Vente J. A., Bosch H., De Haan A.B. and Bussmann P. J. T. (2005a). *Chemical Engineering Communications* **192**, 23.
- Vente J.A., Bosch H., Haan A.B. and Bussmann, P.J.T. (2005b) *Journal of. Chromatography A* **1066**, 71.
- Viard V. and Lameloise M.L. (1992) *Journal of Food Engineering* **17**, 29.

CONCLUSÕES

O efeito da concentração de maltose e sacarose, na síntese de isomalto-oligossacarídeos, a partir da reação do aceptor, utilizando a enzima dextrana-sacarase obtida do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F foi investigada, bem como o estudo de seu alongamento e separação.

Os resultados demonstraram que a síntese enzimática de isomalto-oligossacarídeos foi favorecida utilizando-se a razão molar maltose/sacarose de 1,125, correspondente à 45 e 40 g/L, respectivamente, na faixa considerada neste trabalho.

O estudo do alongamento da cadeia mostrou que a melhor condição de síntese foi realizada em batelada alimentada, com adição da mistura de maltose e sacarose, seguida da alimentação de sacarose somente (10 g/L cada), resultou na formação de isomalto-oligossacarídeos de cadeia longa, com grau de polimerização até nove e no aumento da concentração (79,04 g/L) e distribuição dos mesmos.

Os experimentos de separação indicaram que todas as resinas estudadas adsorveram os açúcares com capacidade variável, segundo a ordem de afinidade: frutose > glicose > maltose > maltoriose > maltotetraose > maltopentaose > maltohexaose > maltoheptaose. Esta ordem de afinidade comum indica a possibilidade de utilização destas resinas como fase estacionária, em leito móvel simulado, obtendo-se um extrato rico em mono e dissacarídeos e um refinado contendo apenas isomalto-oligossacarídeos.

A resina de troca iônica Dowex 50WX4 na forma catiônica H⁺ apresentou melhor desempenho para ser utilizada em unidades de leito móvel simulado, permitindo a separação de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos com menor diluição e maior produtividade, em relação às formas catiônicas K⁺, Na⁺ e Ca²⁺. No entanto, ao utilizar-se uma alimentação real de síntese enzimática, os sais da solução tampão podem levar a uma troca iônica parcial, modificando as características de separação. Deste modo, a forma K⁺ pode ser preferida devido à sua potencial compatibilidade com os requisitos de tamponamento da síntese enzimática.

As informações obtidas no presente estudo indicam a possibilidade da obtenção de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos de cadeia longa, a partir da síntese enzimática com alimentação, proporcionando a formação de um produto diferenciado, com alto valor agregado.

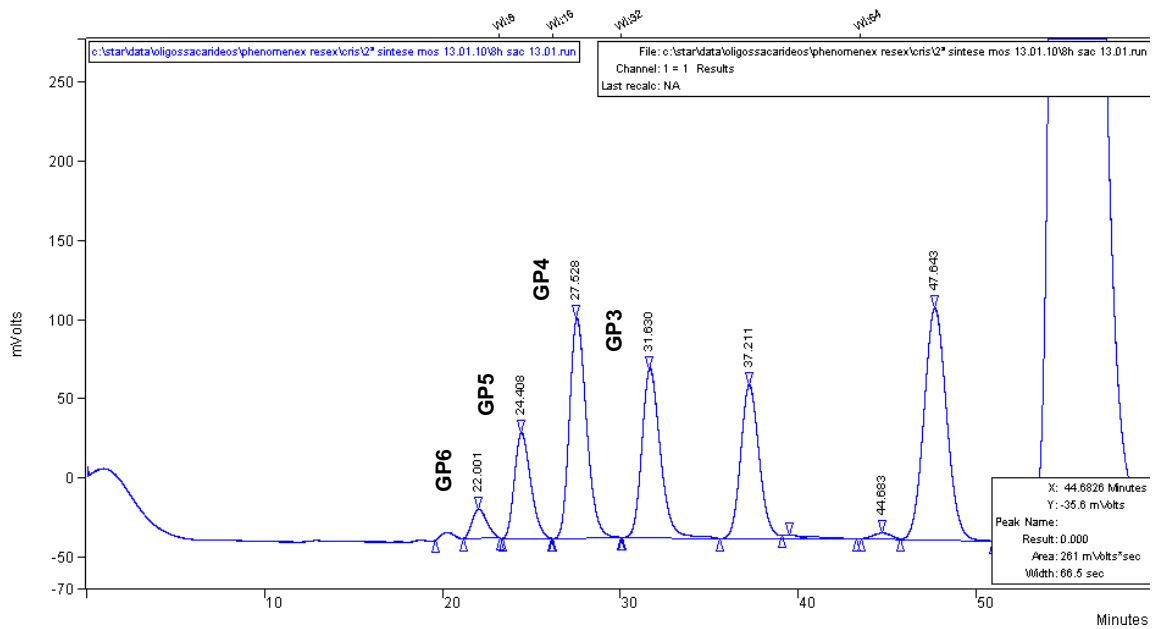
PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os resultados obtidos sugere-se que o funcionamento continuado do reator enzimático com alternância entre as alimentações de maltose e sacarose, seguida somente de sacarose, podem conduzir a graus de polimerização e concentração ainda maiores com produção contínua.

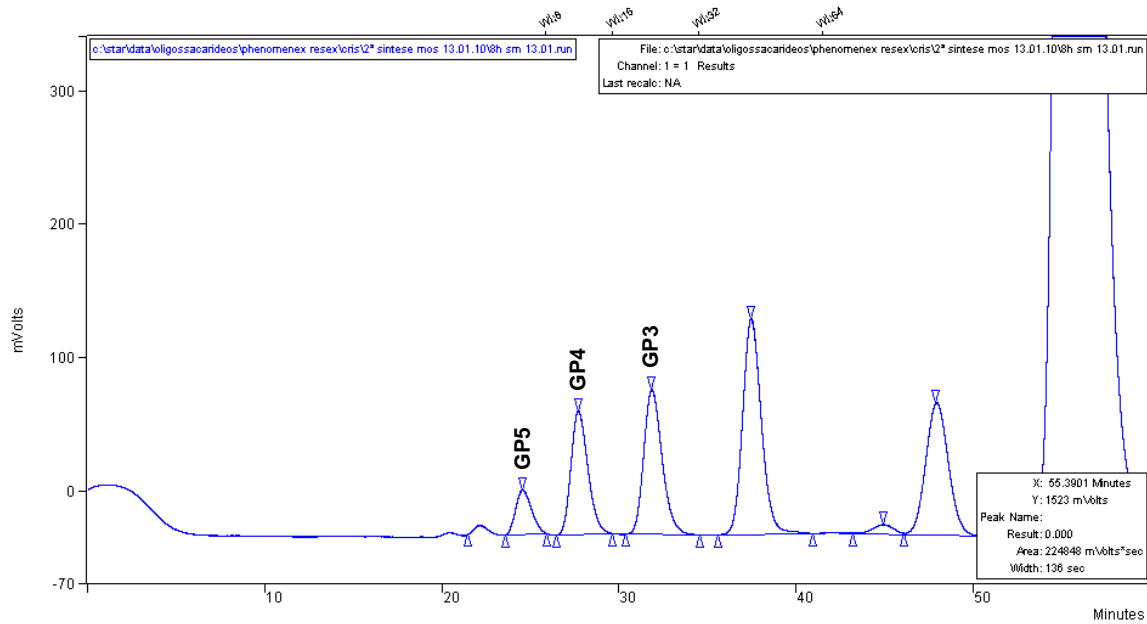
É interessante enfatizar que uma avaliação do tampão utilizado, na síntese dos isomalto-oligossacarídeos, deve ser realizada visto que este pode apresentar influência direta na forma iônica da resina utilizada no processo de separação.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Cromatograma demonstrando o alongamento dos IMOs com adição de sacarose no tempo de 8h de síntese (final). GP3 (panose), GP4 (maltotetraose), GP5 (matopentaose)e GP6 (maltohexaose)



APÊNDICE B - Cromatograma demonstrando o alongamento dos IMOs com adição de sacarose e maltose no tempo de 8h de síntese (final). GP3 (panose), GP4 (maltotetraose) e GP5 (matopentaose)



APÊNDICE C - Cromatograma demonstrando o alongamento dos IMOs com estratégia de alimentação no tempo de 12h de síntese (final). GP3 (panose), GP4 (maltotetraose), GP5 (matopentaose), GP6 (maltohexaose) e GP7 (maltoheptaose)

