

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

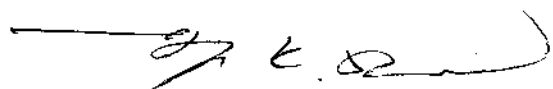
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE POR  $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE  
DE *Bacillus sp* A PARTIR DE LACTOSE E SACAROSE**

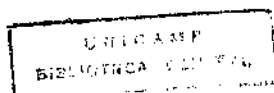
**Masaharu Ikegaki**

Preciso Orientador: Prof. Dr. Yong Kun Park

Este exemplar corresponde a versão  
final da tese defendida por Masaharu  
Ikegaki e aprovada pela  
Comissão Julgadora em 20.10.95



Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da Uni-  
versidade Estadual de Campinas  
para obtenção do Título de Mestre  
em Ciência de Alimentos.



Cm 00081047-7

UNIDADE	BC
CHAMADA:	UNICAMP
	2* 3 R
V.	Ed.
IMPRESSO	87/26176
PREÇO	433/95
C	D
PREÇO	88.11.00
DATA	06/12/95
Nº GPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Ik26p

Ikegaki, Masaharu

Produção de lactosacarose por  $\beta$ -Frutofuranosidase de *Bacillus sp* a partir de lactose e sacarose / Masaharu Ikegaki. -- Campinas, SP: [s.n.], 1995.

Orientador: Yong Kun Park

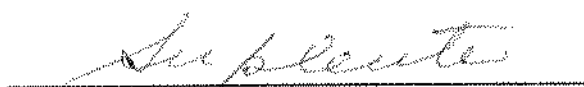
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lactosacarose. 2.  $\beta$ -Frutofuranosidade. 3. *Bacillus sp*. I. Park, Yong Kun. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

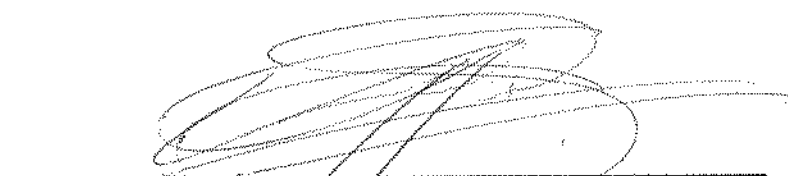
# **RANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Yong Kun Park**  
(orientador)



**Prof. Dr. Hiroshi Aoyama**  
(membro)



**Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho**  
(membro)



**Profa. Dra. Hélia Harumi Sato**  
(membro)

Campinas, 20 de outubro de 1995.

*Ao meu pai Mitsuo,  
minha mãe Emiko e  
à amiga de todos os  
momentos, Luciana,  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela orientação e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Profa Dra. Hélia Harumi Sato pela paciência e amizade durante todo decorrer do trabalho.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela amizade e alegria sempre presente.

Ao Dong Koo Yim pelos conselhos e pelas análises em HPLC.

À Érica, Michel e Contado pela amizade e auxílio no screening de microrganismos.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica pelo companheirismo e amizade durante todo o andamento do trabalho.

Aos funcionários da Secretaria e do Laboratório de Bioquímica (Paulinho e Dorinha).

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE GERAL

	páginas
ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1- Seleção de Linhagens de Microrganismos Produtores de Lactosacarose.....	11
3.1.1- Coleta de Amostras.....	11
3.1.2- Isolamento de Microrganismos.....	11

3.1.3- Seleção de Microrganismos Produtores de $\beta$ -frutofuranosidase	13
3.1.3.1- Determinação da Produção de $\beta$ -frutofuranosidase por Cromatografia Descendente em Papel.....	13
3.1.4- Seleção de Microrganismos Produtores de Lactosacarose.....	14
3.1.4.1- Determinação Qualitativa de Lactosacarose por Cromatografia Descendente em Papel.....	14
3.1.4.2- Determinação Quantitativa de Lactosacarose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	15
3.2- Estudo da Relação Entre o Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e a Produção de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	16
3.2.1- Preparo do Inóculo.....	16
3.2.2- Fermentação.....	16
3.2.3- Determinação do Crescimento do Microrganismo.....	17
3.3- Identificação e Conservação da Linhagem Produtora de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	17

3.4- Produção da $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	18
3.5- Determinação da Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	18
3.6- Produção de Lactosacarose.....	19
3.6.1- Cálculo para Determinação da Conversão de Lactose e Sacarose para Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose e os Açúcares Totais e da Porcentagem de Transfrutossilação.....	19
3.6.2- Determinação da Temperatura Ótima de Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase e de Produção de Lactosacarose.....	20
3.6.3- Determinação do pH Ótimo de Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase e de Produção de Lactosacarose.....	20
3.6.4- Determinação da Cinética de Produção de Lactosacarose.....	21
3.6.5- Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Produção de Lactosacarose.....	21
3.6.6- Efeito da Concentração de Sólidos Totais e da Temperatura na Produção de Lactosacarose.....	22



3.7- $\beta$ -frutofuranosidase.....	23
3.7.1- Produção da $\beta$ -frutofuranosidase.....	23
3.7.2- Purificação da $\beta$ -frutofuranosidase.....	23
3.7.2.1- Concentração da $\beta$ -frutofuranosidase por Ultrafiltração em Membrana.....	23
3.7.2.2- Cromatografia da $\beta$ -frutofuranosidase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	24
3.7.2.3- Cromatografia da $\beta$ -frutofuranosidase em Coluna de CM-Celulose.....	25
3.7.2.4- Cromatografia da $\beta$ -frutofuranosidase em Coluna de Sephadex G-200.....	26
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1- Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	27
4.2- Identificação da Linhagem Produtora de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	28

4.3- Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	29
4.4- Produção de Lactosacarose.....	30
4.4.1- Determinação da Temperatura Ótima de Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase e de Produção de Lactosacarose.....	30
4.4.2- Determinação do pH Ótimo de Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase e de Produção de Lactosacarose.....	31
4.4.3- Determinação da Cinética de Produção de Lactosacarose.....	32
4.4.4- Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Produção de Lactosacarose.....	32
4.4.5- Efeito da Concentração de Açúcares Totais e da Temperatura na Produção de Lactosacarose.....	33
4.5- Determinação do Peso Molecular da $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose de <i>Bacillus sp</i> nº 417.....	34

5- CONCLUSÃO.....	55
6- SUGESTÕES.....	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Características Morfológicas, Bioquímicas e Fisiológicas da  
Linhagem *Bacillus sp* nº 417..... 37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Cromatografia Descendente em Papel das Linhagens Produtoras de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade Hidrolítica	39
Figura 2- Cromatografia Descendente em Papel das Linhagens Produtoras de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.....	40
Figura 3- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Ilustrando a Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Formado de Lactose e Sacarose a 45°C.....	41
Figura 4- Relação Entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento Celular e a Produção de $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para produção de Lactosacarose.....	42
Figura 5- Efeito da Temperatura na Produção de Lactosacarose.....	43
Figura 6- Efeito da Temperatura na Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase...	44
Figura 7- Efeito do pH na Produção de Lactosacarose.....	45
Figura 8- Efeito do pH na Atividade da $\beta$ -frutofuranosidase.....	46

Figura 9- Cinética de Produção de Lactosacarose.....	47
Figura 10- Porcentagem de Conversão de Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose e Açúcares Totais na Cinética de Produção de Lactosacarose.....	48
Figura 11- Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Produção de Lactosacarose.....	49
Figura 12- Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Porcentagem de Conversão de Lactosacarose, Tendo como Base a Sacarose, e de Transfrutossilação.....	50
Figura 13- Efeito da Concentração de Açúcares Totais e da Temperaturas na Produção de Lactosacarose.....	51
Figura 14- Efeito da Concentração de Açúcares Totais e da Temperatura na Porcentagem de Conversão de Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose.....	52
Figura 15- Fluxograma da Determinação do Peso Molecular da $\beta$ -frutofuranosidase de <i>Bacillus sp</i> n° 417.....	53
Figura 16- Relação Entre Volume de Eluição e Peso Molecular das Proteínas em Coluna de Sephadex G-200.....	54

## RESUMO:

Foram isoladas 1341 linhagens de microrganismos a partir de amostras de solos, flores e frutos e testados quanto à produção de  $\beta$ -frutofuranosidase que, além da atividade hidrolítica sobre a sacarose, catalisa a formação de lactosacarose através da transferência de resíduo de frutossil provenientes da sacarose para o acceptor lactose.

Seis linhagens de microrganismos foram preliminarmente selecionadas visando a produção de lactosacarose. Entre estas uma linhagem identificada como *Bacillus sp* n° 417 apresentou alta produtividade de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose a partir de lactose e sacarose.

O pH e a temperatura ótima de atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase foram 5,6 e 45°C, respectivamente. Verificou-se que, após 8 horas de reação, a proporção de lactose e sacarose 1:1 (p/p) e 20% de concentração de açúcares totais, a uma temperatura de 45°C e pH 5,6, foram as melhores condições para produção de lactosacarose.

A enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* n° 417 foi purificada em coluna de troca iônica e o peso molecular da enzima foi estimado em 89.000 Da através de cromatografia em Sephadex G-200.

## SUMMARY

One thousand and three hundred forty one strains of microorganisms were isolated from soils, flowers and fruits samples and examined for production of  $\beta$ -fructofuranosidase which hydrolyze sucrose to glucose and fructose. Those strains of  $\beta$ -fructofuranosidase producing microorganisms were tested for production of lactosucrose from mixture of lactose and sucrose.

Six strains of microorganisms were selected as lactosucrose producers. Among them, one strain, identified as *Bacillus* sp, showed high  $\beta$ -fructofuranosidase transfer activity to lactosucrose production.

The optimum pH and temperature for lactosucrose production were 5,6 and 45°C, respectively. The best condition for the lactosucrose production were: 8 hours of reaction; a ratio lactose to sucrose of 1:1 (w/w) and a total sugar concentration of 20% (1:1, w/w)

The molecular weight of 89.000 Da for  $\beta$ -fructofuranosidase was estimated by Sephadex G-200 chromatography.



## 1- INTRODUÇÃO

Desde o final do século passado sabe-se que a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase ( $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, EC 3.2.1.26), também conhecida como invertase, catalisa a hidrólise da sacarose convertendo-a em glicose e frutose. Mas, em meado da década de 50, descobriu-se que além da atividade hidrolítica, essa enzima possuía também atividade de transferência, ou seja, a  $\beta$ -frutofuranosidase catalisa a transferência de resíduos de frutossil para um outro açúcar que funciona como aceptor (PAZUR,1952; BEALING & BACON,1952; ALBON et alli,1953; BACON & BELL,1953; GROSS et alii,1954). A D-xilose, D-galactose, L-sorbose, maltose, isomaltose, celobiose, lactose e a própria sacarose são aceptores de frutossil, sendo para cada um desses, formado um oligossacarídeo com características diferentes da sacarose (FUJITA et alii,1990b)

Os frutooligossacarídeos formados através da reação catalisada pela  $\beta$ -frutofuranosidase são de grande importância na indústria de alimentos pois são açúcares com baixo teor calórico, não cariogênico e ainda estimulam o crescimento de Bifidobacteria no trato intestinal.

Da família dos frutooligossacarídeos, o “Neosugar”, denominação dada aos açúcares 1-kestose (O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) ou (GF<sub>2</sub>), nistose (O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ou (GF<sub>3</sub>) e 1- $\beta$ -frutofuranosilnistose (O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil-(2-1)- $\beta$ -D-frutofuranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ou (GF<sub>4</sub>),e ainda, 6-kestose e neokestose (PARK et alii,1993), são os mais conhecidos e estudados. Além desses açúcares,

a Lactosacarose (O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)-O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-frutofuranosideo), um frutooligossacarídeo obtido da transferência de unidade de frutossil da sacarose para o aceptor lactose, tem sido descrito na literatura como substituto da sacarose. Assim como o “Neosugar”, a Lactosacarose não é metabolizada pelas enzimas do trato digestivo, portanto, não é calórico e, estimula o crescimento de Bifidobacteria. Tem doçura aproximadamente 30% comparada a sacarose e mantém as características físico-químicas desejáveis da sacarose (FUJITA et alii,1991).

O presente trabalho objetivou o isolamento, seleção e a identificação de linhagens produtoras de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de Lactosacarose, assim como, o estudo de algumas características bioquímicas da enzima bruta. Foi estudada a otimização de produção de Lactosacarose a partir de lactose e sacarose pela  $\beta$ -frutofuranosidase. A enzima foi purificada e o peso molecular foi estimado por filtração em gel.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A invertase foi isolada pela primeira vez a partir de levedura, em 1860 por Berthelot (1860), citado por KULP (1975).

Hedelman (1950), citado por BEALING & BACON (1952), foi quem primeiro observou a formação de oligossacarídeos via transfrutoseilação catalisada pela invertase durante uma reação onde foi utilizado sacarose como substrato.

PAZUR (1952) estudou a reação de transfrutoseilação catalisada pela “transfrutoseidase” produzida por *Aspergillus oryzae*, utilizando sacarose e rafinose como aceptores. Essa enzima age sobre a sacarose sintetizando dois novos oligossacarídeos. Estudos preliminares sobre as suas estruturas demonstraram ser um trissacarídeo, 1-inulobiosil-D-glicose, e um tetrassacarídeo, 1-inulotriosil-D-glicose. Quando se utilizou rafinose como acceptor foram formados um tetrassacarídeo, frutoseilrafinose, um pentassacarídeo de estrutura desconhecida e também melibiose.

BEALING & BACON (1952) estudando a ação de enzimas fúngicas sobre a sacarose verificaram a formação de quatro oligossacarídeos, denominados  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , resultantes da transferência de resíduos de frutoseil para moléculas de sacarose. A adição de extrato enzimático de *Penicillium espinulosum* a uma solução de sacarose, resultava, em cromatografia em papel, em diminuição da

sacarose acompanhada de um acúmulo simultâneo dos oligossacarídeos e da glicose. Verificou-se também que em baixa concentração de substrato ocorria uma maior liberação de frutose, devido a uma insuficiência de moléculas aceptoras. Os autores sugeriram que a enzima utilizada nesse trabalho seria uma  $\beta$ -frutofuranosidase e que a enzima referida por Pazur (1952) como "transfrutosidase" seria a mesma enzima.

ALBON et alii (1953) classificaram como kestose o trissacarídeo formado a partir da sacarose pela invertase de levedura. O composto foi isolado por cromatografia em coluna de celulose e era formado por dois resíduos de frutose e um de glicose. Através da análise dos produtos clivados do açúcar metilado os autores concluíram que a estrutura do trissacarídeo era O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(6 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-frutofuranosídeo.

BACON & BELL (1953) relataram um novo trissacarídeo não redutor formado a partir da ação de "Takadiastase" (um preparado comercial de enzimas fúngicas) sobre a sacarose. Utilizando coluna de carvão ativado-celite, separaram os açúcares em duas frações  $\alpha$  e  $\beta$  que por sua vez se dividiam em duas substâncias denominadas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ;  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , mas somente a fração  $\alpha_1$  foi obtida no estado puro. Por metilação, deduziram que a estrutura dessa substância seria O- $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-frutofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-frutofuranosídeo e que provavelmente seria formado pela transferência enzimática de um radical  $\beta$ -frutofuranosil para sacarose.

GROSS et alii (1954) isolaram um trissacarídeo não redutor, utilizando cromatografia em coluna de carvão ativado-celite, da mistura de reação constituída de uma solução 50% de sacarose e invertase de levedura. Através de técnicas de metilação determinaram a sua estrutura como sendo O-β-D-frutofuranosil-(2→6)-O-α-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-frutofuranosídeo. Essa substância foi formada pela transferência de um radical β-frutofuranosil para sacarose e confirma a teoria que a invertase, independente da origem, tem propriedades em comum como a habilidade de transferir resíduos de frutossil para aceptores que podem ser a água (hidrólise) ou moléculas de álcoois primários. Os autores sugeriram a nomenclatura 1-kestose e 6-kestose para os açúcares isolados por BACON & BELL (1953) e ALBON et alii (1953), respectivamente e, neokestose para o açúcar estudado neste trabalho.

HENDERSON et alii (1959) estudaram a formação de oligossacarídeos a partir de invertase parcialmente purificada de banana comparando com os oligossacarídeos formados pela invertase de levedura. Através de cromatografia em papel, observaram que bananas maduras continham 6<sup>G</sup>-β-frutosilsacarose além da sacarose, glicose e frutose e que a concentração destes açúcares aumentava durante o amadurecimento. A invertase de banana catalisou a formação de oligossacarídeos *in vitro* assim como a invertase de levedura e, que a formação de oligossacarídeo *in vivo*, via transfrutossilação, foi catalisada pela mesma enzima.

HIDAKA et alii (1987) estudaram a transferência de resíduos frutossil para sacarose catalisada pela enzima β-frutofuranosidase produzida por *Aspergillus*

*niger* ATCC 20611. Essa linhagem apresentou alta produtividade enzimática e a sua atividade de transferência foi muito maior que a sua atividade hidrolítica. Verificaram que a concentração de sacarose a 50%, causava um aumento na formação de GF<sub>2</sub> e GF<sub>3</sub>, sendo que nessa concentração ocorria uma rápida conversão de sacarose em frutooligossacarídeos chegando a 60% do total de carboidratos com 24 horas de incubação. Após esse período, ocorria uma parada no consumo de sacarose havendo uma diminuição gradual de GF<sub>2</sub> e um aumento de GF<sub>3</sub> e GF<sub>4</sub> mas, em baixas concentrações de sacarose, havia um aumento dos produtos de hidrólise.

HIRAYAMA et alii (1989) purificaram a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ATCC 20611 produtora de frutooligossacarídeos. Determinaram que o pH e a temperatura ótima de atividade da enzima eram de 5,0-6,0 e 50-60°C, respectivamente. Seu peso molecular foi estimado em 340.000 Da. Essa enzima apresentou alta especificidade para transferência do resíduo de frutossil para o grupo 1-OH do frutofuranosídeo terminal.

FUJITA et alii (1990a) isolaram de amostras de solo uma linhagem de *Arthrobacter* sp K-1, produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase. Essa enzima apresentou pH ótimo entre 6,5-6,8 e temperatura ótima de 55°C. O peso molecular da enzima foi estimado em 52.000 Da por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e em 51.000 Da através de filtração em gel. A enzima hidrolisou sacarose, erlose, rafinose, neokestose e estaquiase com velocidades relativas de 100, 75, 61, 54 e 11, respectivamente, mas quase não hidrolisou 1-kestose e nistose.

FUJITA et alii (1990b) investigaram a transfrutossilação catalisada pela  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-1. Verificaram que essa enzima possui ampla especificidade quanto ao aceptor sendo a D-xilose, D-galactose, L-sorbose, lactose, D- e L-fucose, D- e L-arabinose, maltose, isomaltose, celobiose, melibiose, xilobiose, maltotriose, eficientes aceptores. Por outro lado, D-ribose, L-raminose, D-manose e 1-kestose não foram aceptores eficientes. Vários álcoois primários e açúcares álcoois foram bons aceptores enquanto que álcoois secundários como 2-butanol e 2-propanol não foram bons aceptores. Observaram que para essa enzima efetuar a transferência era necessário que na estrutura do receptor estivesse disponível um grupamento hidroxila livre na ligação equatorial do C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> sobre a conformação <sup>4</sup>C<sub>1</sub> ou <sup>1</sup>C<sub>4</sub>.

USAMI et alii (1991) isolaram a partir de amostras de flores, uma linhagem de fungo identificado como *Penicillium frequentans* produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transfrutossilação. Os autores observaram que a linhagem utilizou a sacarose como a melhor fonte de carbono para produção de enzima. Quando cultivado em meio contendo 15% de sacarose, em condições ótimas por 4 dias, obtiveram a máxima atividade de transfrutossilação. Nessas condições 95% da atividade foi detectada na fração intracelular.

PARK & ALMEIDA (1991) isolaram a partir da cana-de-açúcar uma linhagem de *Aspergillus niger* produtora de transfrutossidase extracelular. Os autores observaram que a rafinose e a sacarose estimulam a produção de enzima. A transfrutossidase apresentou atividade ótima em pH 5,5 e a 55°C, mostrando-se

estável em pH 6,5. A enzima hidrolisou rapidamente a sacarose e, simultaneamente, formou frutooligossacarídeos pela transfrutossilação.

HAYASHI et alii (1991) purificaram e determinaram algumas propriedades de duas  $\beta$ -frutofuranosidases obtidas a partir de *Aureobasidium* sp ATCC 20524. Após extração e purificação das enzimas intracelulares, estimaram os seus pesos moleculares que foram de 318.000 Da para enzima P-1 e 346.000 Da para a enzima P-2. O pH ótimo para reação enzimática foi de 4,5-5,5 para P-1 e 4,5-6,0 para P-2. As  $\beta$ -frutofuranosidases mostraram-se estáveis na faixa de pH 4,0-9,0. A temperatura ótima para ambas as enzimas foi de 50-55°C e o valor de  $K_m$  para sacarose foi de 0,47M para P-1 e 0,65M para P-2.

FUJITA et alii (1991) estudaram a produção de lactosacarose via transfrutossilação catalisada pela  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter* sp K-1. O pH e a temperatura ótima para produção de lactosacarose foram de 5,8-6,2 e 55-60°C, respectivamente. A proporção ótima de lactose e sacarose e a concentração de açúcares ideal foram de 1:1 e 30-40%, respectivamente. A solubilidade da lactosacarose obtida foi de 367g/100ml de água a 25°C e a doçura equivalente a 30% da sacarose.

HAYASHI et alii (1992a) isolaram uma nova linhagem de microrganismo produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase identificada como *Aspergillus japonicus*. Para produção de enzima, meio contendo 20% de sacarose foi a melhor fonte de carbono e 1,5-3,0% de extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio. A



atividade enzimática e o crescimento celular foi máximo após 48 horas de incubação. O pH e a temperatura ótima para reação enzimática foram de 5,0-5,5 e 60-65°C, respectivamente.

HAYASHI et alii (1992b) purificaram e determinaram algumas propriedades da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus* MU-2. O peso molecular da enzima foi estimado em 304.000 Da através de filtração em gel Sephadex G-200. A enzima apresentou pH ótimo de atividade na faixa de 5,5-6,0 e estabilidade na faixa de 4,0-9,0. Em temperaturas abaixo de 65°C a enzima apresentou boa estabilidade e a sua máxima atividade variou entre 60-65°C. O valor de  $K_m$  para sacarose foi de 0,21M e a enzima foi inibida por íons metálicos como prata, chumbo, ferro e, também por p-cloromercuribenzoato em concentrações de 1mM.

HAYASHI et alii (1992c) estudaram duas enzimas  $\beta$ -frutofuranosidasas extracelulares produzida por *Aureobasidium sp* ATCC 20524 que formam 1-kestose a partir de sacarose. As enzimas foram purificadas e o peso molecular das enzimas E-1 e E-2 foram estimadas, respectivamente, em 304.000 Da e 315.000 Da por filtração em gel. Os valores de  $K_m$  para sacarose de E-1 e E-2 foram de 0,34M e 0,28M, respectivamente. As enzimas apresentaram pH ótimo de atividade entre 5,0-5,5 e estabilidade entre 4,0-8,0. Ambas enzimas mostraram temperatura ótima de atividade na faixa de 50-55°C, permaneceram estáveis a 50°C mas eram quase que completamente inativadas a 70°C por 15 minutos.

PARK et alli (1993) isolaram a partir de favo de mel, uma levedura osmofílica identificada como *Candida* sp 228-2 produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência de resíduos de frutose. Após a reação observaram a formação de 3 açúcares não redutores, 1-kestose, 6-kestose e neokestose e, uma frutoseglicose redutora. Utilizando 50% de sacarose como substrato obtiveram a máxima formação de 1-kestose após 48 horas de incubação a 60°C. Os autores obtiveram maior formação de 6-kestose após 24 horas de incubação a 50-55°C enquanto que a produção máxima de neokestose foi verificada após 24 horas de incubação na mesma temperatura.

PARK et alii (1995a) estudaram a produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando  $\beta$ -frutofuranosidase de uma nova linhagem de microrganismo classificada como *Aureobasidium* sp S-7. A enzima produziu, a partir de uma solução a 50% de sacarose, 61,5% de frutooligossacarídeos dos quais 34,6% consistiu de 1-Kestose, 22,7% de nistose e 4,2% de frutofuranosilnistose.

PARK et alii (1995b) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -frutofuranosidase de uma nova linhagem de levedura identificada como *Aureobasidium* sp altamente produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de frutooligossacarídeos. A enzima apresentou pH ótimo de 5,2 e temperatura ótima e estabilidade a 55°C. Foi testada ainda a produção de frutooligossacarídeos utilizando 30 e 50% de sacarose como substrato obtendo 52,4% (frutooligossacarídeos totais) e 70,5% (52,4% de 1-kestose, 16,3% de nistose e 1,8% de frutofuranosilnistose), respectivamente.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1- SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LACTOSACAROSE**

##### **3.1.1- COLETA DE AMOSTRA**

Foram coletados amostras de diversas regiões do Estado de São Paulo. As amostras coletadas consistiram de solo, flores e frutos. As amostras de solo foram coletadas no interior de matas, a beira de rios e próximo das raízes de plantas. Após a remoção das folhas, aproximadamente 50g de solo foram coletados de uma profundidade média de 5 a 10 cm e acondicionadas em sacos plásticos. Já as amostras de flores e frutos foram coletadas em tubos plásticos com tampa contendo 1 ml de meio de enriquecimento que consistiu de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne (LUND & WYATT, 1973), esterilizados previamente.

##### **3.1.2- ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS**

Das amostras de solo, cerca de 0,5-1,0 g foi adicionada em tubos de ensaio contendo 5 ml de água destilada estéril e agitados por cerca de 1 minuto em agitador de tubos. Em seguida a amostra foi inoculada, com uma alça de níquel-cromo, em placas de Petri contendo meio de cultura I composto de 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de ágar. As placas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas para o desenvolvimento dos microrganismos. As colônias isoladas foram repicadas em tubos de ensaio

contendo o meio de cultura I previamente esterilizados e incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas.

Para o isolamento de microrganismos de amostras de flores e frutos coletados em tubos contendo meio de enriquecimento, o conteúdo de cada tubo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml do meio de enriquecimento citado anteriormente. Em seguida os frascos foram incubados a 30°C, a 200 rpm por 3 dias e as amostras do caldo de fermentação foram inoculados com alça de níquel-cromo em placas de Petri contendo o meio I descrito acima. As placas foram incubadas a 30°C durante 24-48 horas para o desenvolvimento dos microrganismos.

As colônias isoladas foram repicadas em tubos de ensaio composto de 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de ágar e incubados a 30°C como descrito anteriormente.

Para a obtenção de culturas puras, os microrganismos foram suspensos em tubos contendo 10 ml de água destilada estéril e inoculados em placas de Petri contendo o meio I. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas e as colônias isoladas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o meio de cultura I.

### **3.1.3- SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE**

Os microrganismos isolados de amostras de solo, flores e frutos, de acordo com o item anterior foram testados quanto a produção de  $\beta$ -frutofuranosidase. Os microrganismos foram inoculados com alça de níquel-cromo em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de meio de enriquecimento previamente esterilizados, descrito no item 3.1.1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C durante 3 dias a 200 rpm. Após a incubação os meios de cultura foram centrifugados a  $10000 \times g$  durante 10 minutos a 5°C e alíquotas de 1 ml de sobrenadante foram transferidos para tubos de Eppendorf. A produção de  $\beta$ -frutofuranosidase foi verificada através de cromatografia em papel dos açúcares do sobrenadante do meio de cultura como descrito no item 3.1.3.1 A atividade de transferência ou produção de lactosacarose a partir de lactose e sacarose no sobrenadante do meio de cultura foi determinada como citado no item 3.1.4.

#### **3.1.3.1-DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL**

Alíquotas de 10 $\mu$ l do sobrenadante dos meios de culturas obtidos de acordo com o item anterior foram aplicados em papel de cromatografia Whatman nº 1, tratado previamente com ácido bórico 0,25 M. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente em papel foi acetato de etila: isopropanol : água destilada na proporção de 6 : 3 : 1 ( v/v ), respectivamente. O

fita de papel de 46cm de comprimento. Como açúcares padrões utilizou-se sacarose, glicose e frutose. Os açúcares foram revelados com anilina-difenil-amina-ácido orto-fosfórico (SCHWIMMER & BEVENUE, 1956).

### **3.1.4- SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LACTO-SACAROSE**

Os microrganismos produtores de  $\beta$ - frutofuranosidase, selecionados de acordo com o item 3.1.3, foram testados quanto a atividade de transferência para a produção de lactosacarose a partir de lactose e sacarose. A mistura de 100 $\mu$ l de solução 12,75% de lactose e 100 $\mu$ l de solução 8,6% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,02M pH 6,2 e 50 $\mu$ l de sobrenadante do meio de cultura obtido de acordo com o item 3.1.3 foi incubada a 40°C por 4 horas. Após a incubação a mistura de reação foi aquecida em banho-maria a 100°C por 10 minutos. A produção de lactosacarose foi testada qualitativamente e quantitativamente através de cromatografia descendente em papel e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente.

#### **3.1.4.1- DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE LACTOSACAROSE POR CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL**

Alíquotas de 8 $\mu$ l da mistura de reação foram aplicadas em papel Whatman nº 1 tratado previamente com ácido bórico 0,25M. O sistema de solvente utilizado foi butanol : piridina : água destilada na proporção de 6 : 4 : 3 ( v/v ), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi

aproximadamente 18 horas, para fita de papel de 46 cm de comprimento. Como açúcares padrão foram utilizados glicose, frutose, lactose, sacarose e lactosacarose. Os açúcares foram revelados com anilina-difenilamina-ácido ortofosfórico (SCHWIMMER & BEVENUE, 1956)

#### **3.1.4.2- DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE LACTOSACAROSE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

As amostras das misturas de reação obtidas de acordo com o item 3.1.4 foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência CG 480C, detector de índice de refração CG 410, coluna Shodex Ionpak 802 ( 8mm × 300mm ) a 50°C. Utilizou-se água destilada e filtrada e degaseificada como fase móvel com fluxo de 1 ml/minuto. Os açúcares foram identificados, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de lactosacarose, glicose e frutose.

A linhagem maior produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência foi selecionada para estudos de caracterização da enzima bruta, a otimização da produção de lactosacarose e a determinação do peso molecular da enzima.

### **3.2- ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA PARA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

#### **3.2.1- PREPARO DO INÓCULO**

As linhagens selecionadas foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado composto de 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de ágar e os tubos incubados a 30°C durante 24 horas. Adicionou-se 10 ml de água destilada esterilizada ao tubo de cultura e a superfície do meio foi raspada com alça de níquel-cromo para a preparação de suspensão celular homogênea.

#### **3.2.2- FERMENTAÇÃO**

A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de meio de cultura descrito no item 3.1.1. Aliquotas de 1 ml da suspensão celular foram adicionadas assepticamente em 10 frascos de Erlenmeyer. A fermentação foi realizada a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm e os frascos foram retirados em diferentes intervalos de tempo para determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de lactosacarose.



### **3.2.3- DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO**

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm (MALLETTE, 1969). Após a fermentação, a amostra de 10 ml do meio de cultura foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi armazenado a -10°C e a massa celular submetida a três lavagens sucessivas com 10 ml de água destilada nas mesmas condições descritas acima. A massa celular da última lavagem foi ressuspensa em 10 ml de água destilada. A leitura de absorbância da amostra foi realizada contra água destilada a 660 nm.

### **3.3- IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA PARA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O microrganismo produtor de  $\beta$ -frutofuranosidase foi identificado através das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de acordo com Mac Faddin (1980) e Krieg & Holt (1984). Para manutenção, o microrganismo foi cultivado em meio inclinado contendo sacarose 4%, peptona 1%, extrato de carne 0,4% e ágar 2%. Após incubação durante 24 horas a 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de ensaio. A cultura foi conservada a 5°C, com repicagem a cada 2 meses.

### **3.4- PRODUÇÃO DE ENZIMA COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA**

A produção de enzima com atividade de transferência foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml do meio de cultura constituído de 4% e sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne. Os frascos esterilizados foram inoculados com 1 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.1 e incubados em agitador rotatório a 30°C e 200 rpm por 72 horas. Após fermentação o meio de cultura foi centrifugado a  $10000 \times g$  durante 10 minutos a 5°C e o sobrenadante do meio de cultura utilizado como preparação de enzima bruta.

### **3.5- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE**

Para determinação da atividade de  $\beta$ -frutofuranosidase, 0,9 ml de solução 20 % de açúcares totais (1:1 p/p) em tampão citrato fosfato 20 mM pH 5,6 foi incubado em banho de água termostatizado a 45°C por 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir foi adicionado 0,1 ml da solução de enzima e a mistura de reação foi incubada a 45°C por 1 hora e a concentração de lactosacarose foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2. Uma unidade de atividade foi definida como a capacidade da enzima produzir 1  $\mu$ mol de lactosacarose/minuto/ml de enzima bruta.

### 3.6- PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE

#### 3.6.1- CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO DE LACTOSE E SACAROSE PARA LACTOSACAROSE TENDO COMO BASE A SACAROSE E OS AÇÚCARES TOTAIS E DA PORCENTAGEM DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

Para determinação do cálculo da conversão de lactose e sacarose para lactosacarose tendo como base a sacarose e os açúcares totais e a porcentagem de transfrutossilação foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$(1) \quad \frac{\text{LACTOSACAROSE (mg/ml)}}{\text{SACAROSE (mg/ml)}} \times 100 = \% \text{ de conversão}$$

$$(2) \quad \frac{\text{LACTOSACAROSE (mg/ml)}}{\text{AÇÚCARES TOTAIS (mg/ml)}} \times 100 = \% \text{ de conversão}$$

$$(3) \quad \frac{\text{GLICOSE - FRUTOSE}}{\text{GLICOSE}} \times 100 = \% \text{ de transferência}$$

### **3.6.2- DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE E DE PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase foi testado na faixa de 35 a 55°C de acordo com o item 3.5, sendo considerado a atividade relativa para efeito de comparação.

Para o estudo da determinação da temperatura ótima para produção de lactosacarose o sistema de reação foi constituído de 1 ml de solução 8,6% de sacarose em tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,2, 1 ml da solução 12,75% de lactose em tampão citrato-fosfato 20mM pH 6,2 e 0,5 ml da preparação de enzima bruta obtida como descrito no item 3.4. A mistura da reação foi incubada em diversas temperaturas entre 40°C a 55°C durante 2 horas. A produção de lactosacarose foi determinada pelo método descrito no item 3.1.4.2.

### **3.6.3- DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE ATIVIDADE DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE E DE PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O efeito do pH na atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase foi testado utilizando-se soluções tampões adequadas na faixa de pH entre 4,0 e 7,0, sendo considerado a atividade relativa para efeito de comparação.

Para o estudo do efeito do pH na produção de lactosacarose o sistema de reação foi constituído de 1 ml de solução 8,6% de sacarose em tampão citrato-fosfato 20mM de diferentes valores de pH, 1 ml de solução 12,75% de lactose em tampão citrato-fosfato 20mM de diferentes valores de pH e 0,5 ml da

preparação enzimática bruta obtida como descrito no item 3.4. A mistura de reação foi incubada em banho de água termostatizado a 45°C por 2 horas. Após a incubação, a produção de lactosacarose foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2.

#### **3.6.4- DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE LACTO-SACAROSE**

Para o estudo da cinética de formação de lactosacarose, o sistema de reação foi constituído de 5 ml de solução 8,6% de sacarose em tampão citrato-fosfato 20mM pH 5,6, 5 ml de solução 12,75% de lactose em tampão citrato-fosfato 20mM pH 5,6 e 2,5 ml da preparação de enzima bruta obtida como descrito no item 3.4. A mistura da reação foi incubada a 45°C sendo retiradas alíquotas em vários intervalos de tempo. Após a incubação, a produção de lactosacarose foi determinada de acordo com o método citado no item 3.1.4.2

#### **3.6.5- EFEITO DA PROPORÇÃO DE LACTOSE E SACAROSE NA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

Para o estudo do efeito da proporção de lactose e sacarose na produção de lactosacarose foram preparados 5 soluções contendo em cada uma delas diferentes proporções (3:1; 2:1; 1:1; 1:2 e 1:3) dissolvidos em tampão citrato-fosfato 20mM pH 5,6. O sistema de reação foi constituído de 2 ml da solução de diferentes proporções de açúcares e 0,5 ml da preparação de enzima bruta obtida como descrito no item 3.4. As misturas de reação foram incubadas a 45°C em

banho de água termostatizado por 8 horas. Após incubação, a produção de lactosacarose foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2 e a produtividade de lactosacarose tendo como base a sacarose, sólidos totais e a porcentagem de transferência foram calculados de acordo com as equações citadas no item anterior.

### **3.6.6- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

Para o estudo da concentração de sólidos totais na produção de lactosacarose foram preparadas soluções contendo 20, 30, 40 e 50% de açúcares totais na proporção de 1:1 (p/p) de lactose e sacarose em tampão citrato-fosfato 20mM pH 5,6. O sistema de reação foi constituído de 2 ml da solução de diferentes concentrações de sólidos totais mais 0,5 ml da preparação de enzima bruta obtida como descrita no item 3.4. A mistura de reação foi incubada em banho de água termostatizado em diferentes temperaturas (45, 50 e 55°C) por 22 horas. Após a incubação, a produção de lactosacarose foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2 e a produtividade tendo como base a sacarose, sólidos totais e a porcentagem de transferência foram calculadas de acordo com as equações citadas no item 3.6.1.

### **3.7- $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE**

#### **3.7.1- PRODUÇÃO DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE**

A produção de enzima com atividade de transferência foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml do meio de cultura constituído de 4% e sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne. Os frascos esterilizados foram inoculados com 1 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.1 e incubados em agitador rotatório a 30°C e 200 rpm por 72 horas. Após fermentação o meio de cultura foi centrifugado a 10000  $\times$  g durante 10 minutos a 5°C e o sobrenadante do meio de cultura utilizado como preparação de enzima bruta.

#### **3.7.2- PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE**

##### **3.7.2.1- CONCENTRAÇÃO DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE POR ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA**

Amostra de 3500 ml de sobrenadante contendo  $\beta$ -frutofuranosidase obtida de acordo com o item 3.7.1 foi concentrada por sistema de ultrafiltração Amicon, modelo TCF2/TCF2A em membrana de 10.000 Da até obter um volume final de 200 ml que foi dialisado contra água destilada a 5°C durante 48 horas e , posteriormente, contra tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 a 5°C por 24 horas. A amostra de enzima dialisada foi percolada em coluna de DEAE-Sephadex A-50 de acordo com as condições descritas a seguir.

### **3.7.2.2- CROMATOGRAFIA DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50**

Tratou-se previamente 30g de DEAE-Sephadex A-50 com 500ml de NaOH 0,5 N por 30 minutos, filtrou-se em lã de vidro e lavou-se com água destilada para a remoção do NaOH. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de HCl 0,5 N por 30 minutos. Novamente a resina foi lavada com água destilada para a remoção do ácido e, finalmente, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6.

A solução enzimática obtida no item 3.7.2.1 foi aplicada em coluna de 2,5 cm de diâmetro x 40 cm de comprimento de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 230 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 e 300 ml de gradiente de concentração de sal. Este último foi preparado através de sistema de vasos comunicantes em que o recipiente adaptado à coluna continha 200 ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6 e o vaso comunicante continha 500 ml de solução de NaCl 1N em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6. Frações de 5,0 ml foram coletados a cada 30 minutos e o curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o item 3.5. As frações contendo atividade de  $\beta$ -frutofuranosidase foram reunidas e a amostra foi dialisada contra água destilada durante 24 horas a 5°C. A solução enzimática foi concentrada por ultrafiltração em membrana de 10.000 Da e aplicada em coluna de CM-celulose de acordo com o método descrito a seguir.



### **3.7.2.3- CROMATOGRAFIA DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE EM COLUNA DE CM-CELULOSE**

Tratou-se 35 g de CM-Celulose com 500 ml de HCl 0,5 N por 30 minutos, filtrou-se em lã de vidro e lavou-se com água destilada para remoção do HCl. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de NaOH 0,5 N por 30 minutos e lavada com água destilada para remoção da base e, finalmente, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6.

A amostra de solução enzimática obtida de acordo com o item anterior foi aplicada em coluna de CM-Celulose de 2,5 cm de diâmetro x 40 cm de comprimento. Iniciou-se a eluição com 100 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 e em seguida com 300 ml de gradiente de concentração de sal. Este último foi preparado através de sistema de vasos comunicantes em que o frasco adaptado à coluna continha 200 ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6 e o frasco comunicante continha 500 ml de solução de NaCl 1N em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6. A eluição das proteínas foi acompanhada pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o item 3.5. As frações contendo atividade de  $\beta$ -frutofuranosidase foram reunidas e a amostra foi dialisada em água destilada por 24 horas a 5°C e, em seguida, concentrada por ultrafiltração em membrana de 10.000 Da.

### **3.7.2.4- CROMATOGRAFIA DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE EM COLUNA DE SEPHADEX G-200**

Estimou-se o peso molecular da enzima por filtração em coluna de gel Sephadex G-200, baseado na metodologia descrita por ANDREWS, 1965. Previamente, 50g de Sephadex G-200 foi intumescida com 2 litros de solução KCl 0,1 M durante 2 dias a 10°C e em seguida equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo KCl 0,1 M. Foram utilizadas como padrões as proteínas imunoglobulina G e albumina de soro bovino de peso molecular 150.000 e 66.000, respectivamente. As proteínas padrões foram dissolvidas em 1 ml da enzima purificada obtida de acordo com o item anterior e completado para um volume final de 2 ml com mesmo tampão e percoladas em coluna de 2,5 cm de diâmetro x 50 cm de comprimento. Frações de 3 ml foram coletadas a cada 18 minutos e a coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão pelo uso de "Blue Dextran 2000".

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1-ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LACTOSACAROSE

Foram isolados 1341 linhagens de microrganismos, obtidos a partir de diversas fontes, e testados quanto a produção de  $\beta$ -frutofuranosidase de acordo com o item 3.1.3. Verificou-se que entre as linhagens estudadas, 356 linhagens produziram  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade hidrolítica (Figura 1), determinado de acordo com o item 3.1.3.1. Entre as linhagens produtoras de  $\beta$ -frutofuranosidase, 6 linhagens apresentaram  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose (Figura 2). Segundo HIDAKA et alii (1988) a  $\beta$ -frutofuranosidase comumente possui atividade de transferência (Ut) e de hidrólise (Uh) e que para uma produção eficiente de frutooligosacarídeos a enzima deve apresentar alta razão Ut/Uh e, além disso, o microrganismo deve apresentar alta produtividade de enzima. Das 6 linhagens selecionadas, a de número 417, isolada de solo, apresentou alta produtividade de lactosacarose.

Uma linhagem de *Arthrobacter sp* K-I isolada por FUJITA et alii (1990) a partir de amostras de solo, produziu lactosacarose via transfrutossilção catalisada pela  $\beta$ -frutofuranosidase.

Através de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 3), verificou-se que a  $\beta$ -frutofuranosidase da linhagem 417 apresentou alta atividade de transfrutossilção para o acceptor lactose no sistema de reação. Os açúcares foram identificados por comparação do tempo de retenção de açúcares padrões. Os

carboidratos padrões lactosacarose, sacarose, lactose, glicose e frutose apresentaram tempo de retenção 7:32, 7:42, 7:43, 8:52 e 9:22 minutos, respectivamente.

#### 4.2- IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA PARA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE

A linhagem 417, produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose, foi identificada como *Bacillus sp.* As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas dessa linhagem estão ilustradas na Tabela 1. O microrganismo *Bacillus sp* não foi descrito na literatura como produtor de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose. O único trabalho encontrado na literatura sobre produção de lactosacarose foi descrito por FUJITA et alii, (1991). Os autores utilizaram a  $\beta$ -frutofuranosidase extracelular de *Arthrobacter sp* K-I com atividade de transferência para produção de lactosacarose a partir de lactose e sacarose. Vários microrganismos foram citados na literatura como produtores de outros frutooligossacarídeos como 1-kestose, nistose e 1-frutofuranosilnistose catalisada pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase entre eles *Aspergillus oryzae* (PAZUR,1952), *Aspergillus niger* [(HIDAKA, et alii, 1987; PARK & ALMEIDA, 1991)]; *Penicillium frequentans* (*P. glabum*) (USAMI et alii,1991); *Aureobasidium sp* (HAYASHI et alii, 1991), *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI et alii, 1992); *Candida sp* (PARK et alli, 1993).

#### **4.3- ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA PARA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O estudo do crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultura e produção de  $\beta$ -frutofuranosidase para produção de lactosacarose pela linhagem de *Bacillus sp* n° 417, foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.

A Figura 4 ilustra a relação entre o tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, e a produção de  $\beta$ -frutofuranosidase para produção de lactosacarose. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a atividade da enzima atinge o valor máximo de 2,4U/mL na fase final do crescimento exponencial após 12 horas de fermentação. HIDAOKA et alii (1988) verificou que a maior produção de  $\beta$ -frutofuranosidase por *Aspergillus niger* ATCC 20611 ocorreu na fase inicial do crescimento exponencial após 24 horas de fermentação a 28°C. Em comparação a linhagem de *Aspergillus japonicus* MU-2 estudada por HAYASHI et alii, (1992) apresentou a máxima atividade durante a fase exponencial de crescimento após 48 horas de fermentação a 30°C.

## 4.4- PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE

### 4.4.1- DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE E DE PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE

O efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase e na produção de lactosarose foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.6.2. A Figura 5 apresenta a concentração de lactosacarose formada em função da temperatura. A temperatura ótima para produção de lactosacarose catalisada pela  $\beta$ -frutofuranosidase da linhagem *Bacillus sp* n° 417 foi de 45°C. Fujita et alii, (1991) verificaram que a produção de lactosacarose pela  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-I foi máxima na faixa de temperatura de 55-60°C.

A  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* n° 417 apresentou atividade ótima a 45°C, como ilustra a Figura 6. HIRAYAMA et alii, (1989) verificaram que a  $\beta$ -frutofuranosidase *Aspergillus niger* ATCC 20611 apresentou atividade ótima na faixa de 50-60°C em mistura de reação contendo 10% de sacarose após 1 hora de reação. HAYASHI et alii, (1991) trabalhando com duas frações de  $\beta$ -frutofuranosidase intracelulares de *Aureobasidium sp* ATCC 20524, verificaram que a temperatura ótima para ambas as frações foi entre 50-55°C. PARK & ALMEIDA, (1991) estudando a  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* determinou que a temperatura ótima de atividade foi de 55°C, diferente da  $\beta$ -frutofuranosidase produzida por *Candida sp* (PARK et alii, 1993), onde a atividade ótima da enzima variou entre 50-60°C dependendo do tempo de incubação.

#### 4.4.2- DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE E DE PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE

Para o estudo do efeito do pH na atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase e na produção de lactosacarose seguiu-se a metodologia descrita no item 3.6.3. De acordo com a Figura 7, que expressa a concentração de lactosacarose formada em função dos diferentes valores de pH, observou-se que o pH ótimo na produção de lactosacarose foi de 5,6 em tampão citrato-fosfato. A linhagem de *Arthrobacter sp* K-I (FUJITA et alii, 1991) apresentou pH ótimo de 5,8 em tampão citrato-fosfato para produção de lactosacarose.

Analizando o efeito do pH na atividade da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase da linhagem de *Bacillus sp* n° 417 obteve-se o pH ótimo de 5,6 (Figura 8). O pH ótimo de atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência de unidades de frutossil tem sido descrito na literatura. HIRAYAMA et alii, (1989) trabalhando com  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência de *Aspergillus niger* ATCC 20611 determinaram que o pH ótimo de atividade variou entre 5,0-6,0. Uma outra  $\beta$ -frutofuranosidase produzida por *Arthrobacter sp* K-I (FUJITA et alii, 1990a) possui atividade ótima em pH que variou de 6,5-6,8. A linhagem de *Aspergillus niger* descrita por PARK & ALMEIDA, (1991) apresentou pH ótimo de atividade entre 5,5-6,5. HAYASHI et alii, (1991) determinaram que as frações P-1 e P-2 de  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 possuíam atividade ótima entre 4,5-5,5 e 4,5-6,0, respectivamente. Estes mesmos autores (HAYASHI et alii, 1992a) estudando a  $\beta$ -frutofuranosidase da linhagem de *Aspergillus japonicus* MU-2 observaram que a enzima mostrou pH ótimo de atividade na faixa de 5,0-5,5.

#### **4.4.3- DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA LACTOSACAROSE**

O estudo da cinética de produção de lactosacarose foi realizado como descrito no item 3.6.4. Como pode ser observado na Figura 9, a máxima produção de lactosacarose catalisada pela enzima  $\beta$ -frutofuranosidase foi obtida após 8 horas de reação. A Figura 10 ilustra a porcentagem de conversão tendo como base a sacarose e os açúcares totais calculadas de acordo com o item 3.6.1, onde se verificou 73,37% de conversão tendo como base a sacarose. A  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-I, isolada por FUJITA et alii, (1991) apresentou uma cinética de produção de lactosacarose semelhante à linhagem estudada, onde em 8 horas de reação, 40% de açúcares totais [lactose e sacarose, 1:1 (p/p)] a 50°C foi obtido maior formação de lactosacarose com uma conversão de 45% tendo como base a sacarose.

#### **4.4.4- EFEITO DA PROPORÇÃO DE LACTOSE E SACAROSE NA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O estudo do efeito da proporção de lactose e sacarose na produção de lactosacarose foi realizado como descrito no item 3.6.5. A Figura 11 mostra a produção de lactosacarose em função de diferentes proporções de lactose e sacarose. A proporção que apresentou maior produção de lactosacarose foi na relação 1:1 (p/p) onde se obteve 17,75 mg/mL de lactosacarose. Esse resultado foi semelhante ao obtido por FUJITA et alii, (1991) onde utilizando a enzima  $\beta$ -frutofuranosidase produzida por *Arthrobacter sp* K-I e 50% de açúcares totais, a



40°C por 20 horas foi obtido a relação 1:1 (p/p) de lactose e sacarose como a melhor proporção entre os açúcares para formação de lactosacarose.

Observando a Figura 12, que expressa as porcentagens de conversão e transfrutossilação, calculadas de acordo com o item 3.6.1, em função das diferentes proporções de lactose e sacarose, verificou-se que quanto maior a proporção de lactose (acceptor) há um aumento na porcentagem de transferência e uma diminuição na conversão de lactosacarose. Isso se deve ao fato de que havendo uma grande quantidade de acceptor há um maior grau de transferência de resíduos de frutossil para este acceptor, mas devido a baixa concentração de sacarose (doador) este último se torna escasso rapidamente, acarretando numa menor formação de lactosacarose. O mesmo resultado foi obtido quando ocorre a situação inversa onde há um aumento da proporção de sacarose (doador) e uma diminuição da lactose (acceptor), mas nesse caso, há uma diminuição na porcentagem de transferência já que a concentração do acceptor é baixa. O melhor resultado se observou quando quantidades equivalentes de lactose e sacarose foram utilizadas pois, nesse caso, não havia excesso de acceptor nem de doador que levasse a uma diminuição na formação de lactosacarose.

#### **4.4.5- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

O efeito da concentração de açúcares totais na produção de lactosacarose foi determinado de acordo com o item 3.6.6. A Figura 13 ilustra a produção de lactosacarose em função da concentração de açúcares totais (lactose:sacarose 1:1, p/p) e da temperatura. Verificou-se que houve maior formação de

lactosacarose a medida que aumentava a concentrações de açúcares totais. Contudo, quando se tratou de rendimento de lactosacarose (Figura 14) a concentração de 20% apresentou melhor resultado a 45°C atingindo 54,42% de conversão, sendo que nas demais concentrações foram obtidos resultados satisfatórios alcançando valores entre 47-50% de conversão tendo como base a sacarose a 45°C. Nas demais temperaturas (50 e 55°C) a formação de lactosacarose diminuiu consideravelmente, principalmente a 55°C, com valores de conversão de lactosacarose , tendo como base a sacarose, não superiores a 43% (Figura 14). FUJITA et alii, (1991), estudando a influência da concentração de açúcares totais na produção de lactosacarose,utilizando a  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-I, obtiveram maior rendimento de lactosacarose empregando concentrações de açúcares totais na faixa de 30-40%, após 15-24 horas de reação a 50°C. Nessas condições foi obtido 48% de conversão tendo como base a sacarose. Os autores observaram ainda que utilizando 60% de açúcares totais a enzima convertia apenas 38% da sacarose após 24 horas de reação.

#### **4.5- DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA $\beta$ -FRUTOFURANOSIDASE DE *Bacillus sp* n° 417 COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA PARA PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE**

A determinação do peso molecular da  $\beta$ -frutofuranosidase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.7. A Figura 15 apresenta o fluxograma da determinação do peso molecular da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* n° 417. O peso molecular da enzima foi estimado em 89.000 Da através de filtração em

gel Sephadex G-200. A Figura 16 mostra a relação entre o volume de eluição e peso molecular das proteínas em coluna de Sephadex G-200.

Segundo dados da literatura, a  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA et alii, 1989) apresentou peso molecular de 340.000 Da em filtração em gel Sephadex G-200. A análise em SDS-PAGE indicou que a enzima possuía uma única banda de proteína com peso molecular de 100.000 Da sugerindo a presença de subunidades estruturais na enzima. A  $\beta$ -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-I (FUJITA et alii, 1990a) apresentou peso molecular de 51.000 Da em filtração em gel Ultrogel AcA44 e 52.000 Da em SDS-PAGE, sugerindo que a enzima se encontra em estado monomérico. No estudo de  $\beta$ -frutofuranosidases intracelulares de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 (HAYASHI et alii, 1991) os pesos moleculares das frações P-1 e P-2 foram estimados em 318.000 Da e 346.000 Da, respectivamente, em filtração em gel Sephadex G-200. O peso molecular da  $\beta$ -frutofuranosidase produzida por *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI et alii, 1992b) foi estimado em 304.000 Da através de filtração em gel Sephadex G-200.

TABELA

Tabela 1: Características Morfológicas, Bioquímicas e Fisiológicas da Linhagem de *Bacillus sp* n° 417.

**TESTES DE IDENTIFICAÇÃO:**

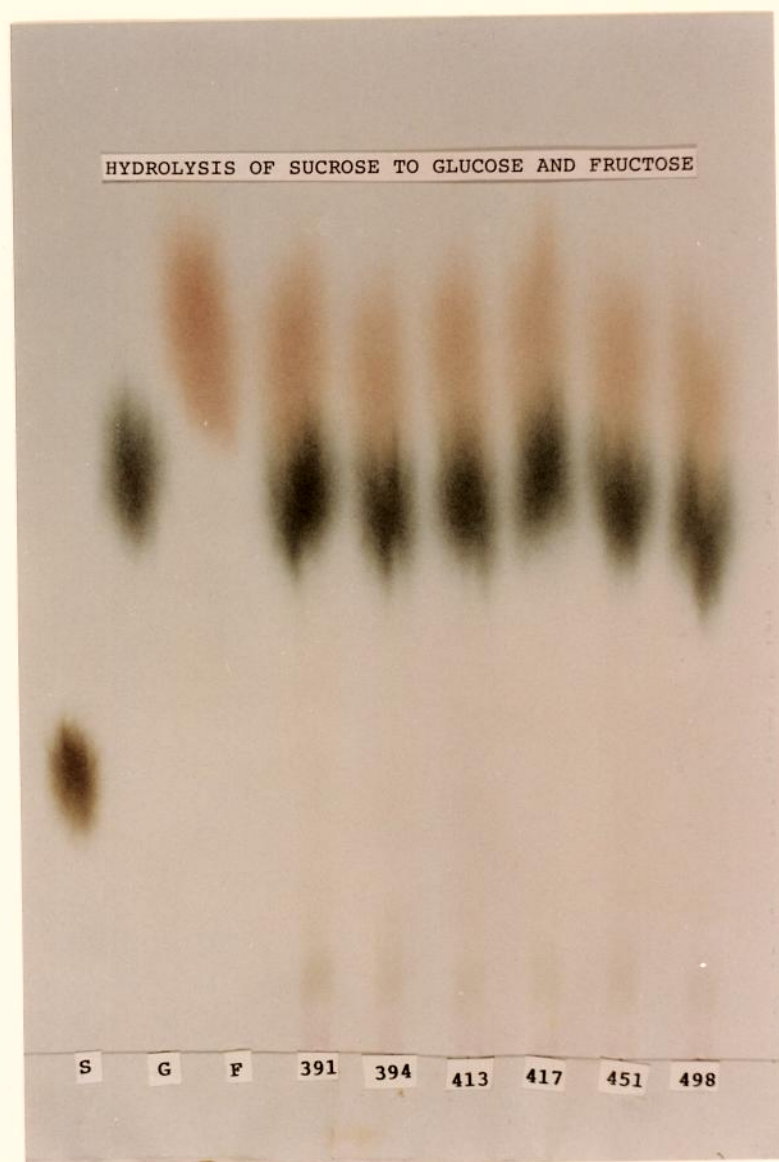
GRAM	positivo	MOTILIDADE	negativo
ESPORO	central, oval	VM*	positivo
AERÓBICO		VP#	negativo
OXIDASE	negativo	HEMÓLISE	positivo
CATALASE	positivo	$\alpha$ -AMILASE	positivo
CITRATO	negativo		

\* VM- Vermelho de Metila  
# VP- Voges Proskauer

**FERMENTAÇÃO DE ACÚCARES**

SACAROSE	positivo	INOSITOL	negativo
GLICOSE	positivo	XILOSE	negativo
MANITOL	positivo	MALTOSE	negativo
ARABINOSE	positivo		

## FIGURAS



G-glicose

F-frutose

S-sacarose

Figura 1: Cromatografia Descendente em Papel Ilustrando a Atividade Hidrolítica da  $\beta$ -frutofuranosidase Sobre a Sacarose Após 72 Horas de Fermentação.



G- glicose

F- frutose

S- sacarose

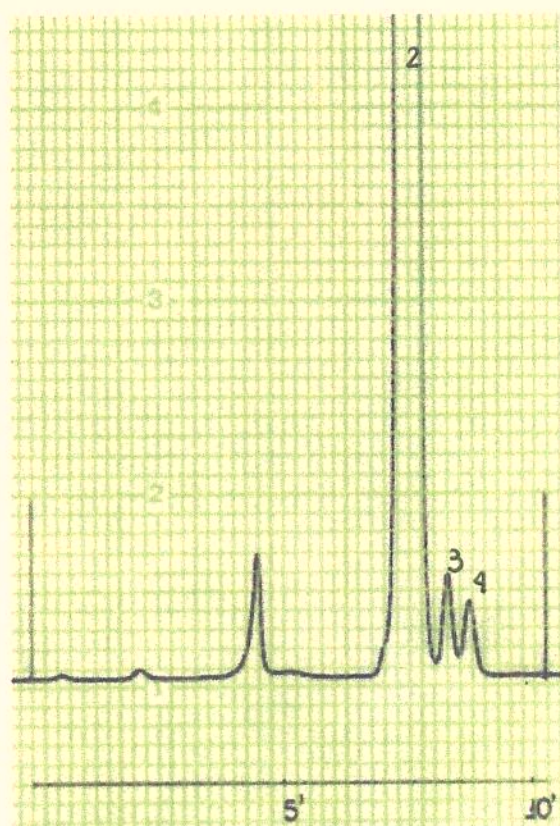
L- lactose

LS- lactosacarose

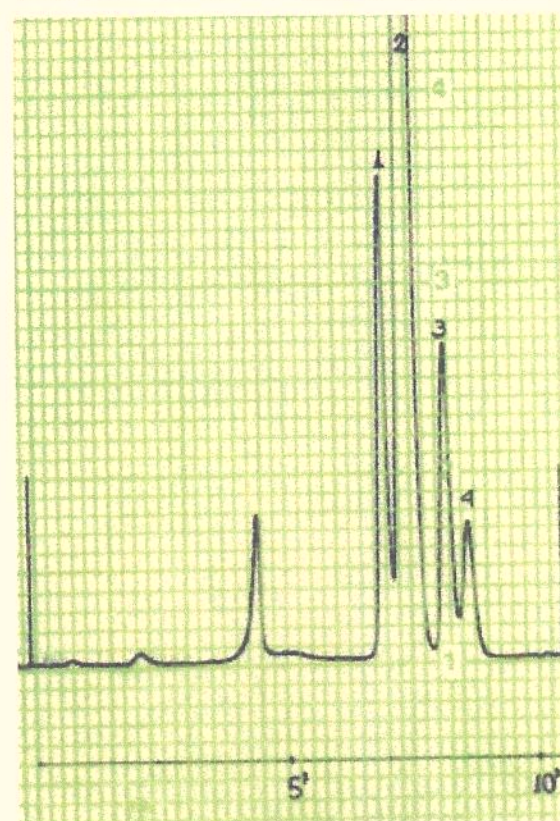
Figura 2: Cromatografia Descendente em Papel Ilustrando a Atividade de Transferência da  $\beta$ -frutofuranosidase para Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Contendo Lactose e Sacarose a 45°C com 1 Hora de Reação.



A



B



1- lactosacarose; 2- sacarose + lactose; 3- glicose e 4- frutose

Figura 3: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Ilustrando a Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Composto de Lactose e Sacarose. (A- tempo zero de reação. B: 3 horas de reação 45°C)

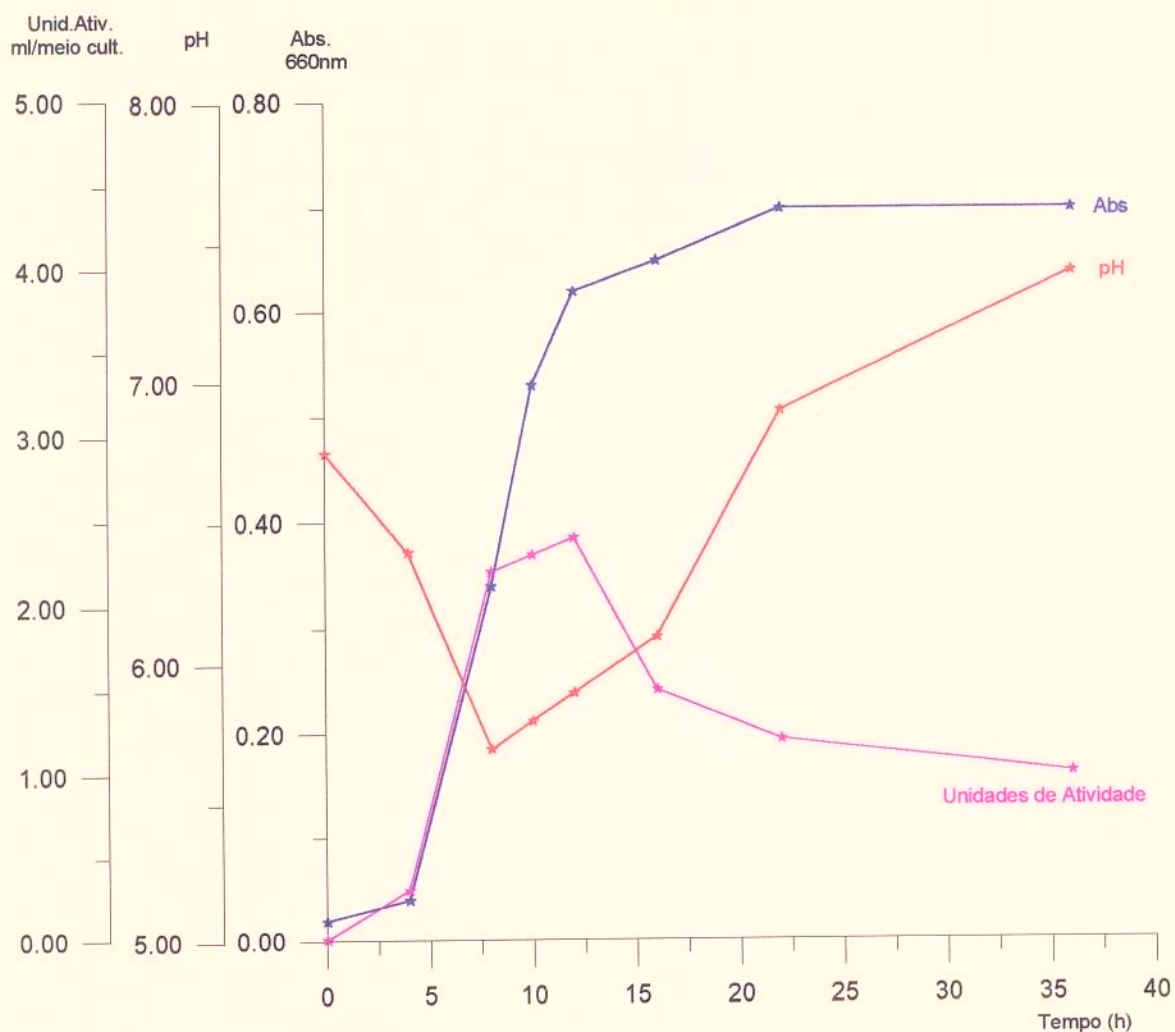


Figura 4: Relação Entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento Celular e a Produção de  $\beta$ -frutofuranosidase com Atividade de Transferência para Produção de Lactosacarose.

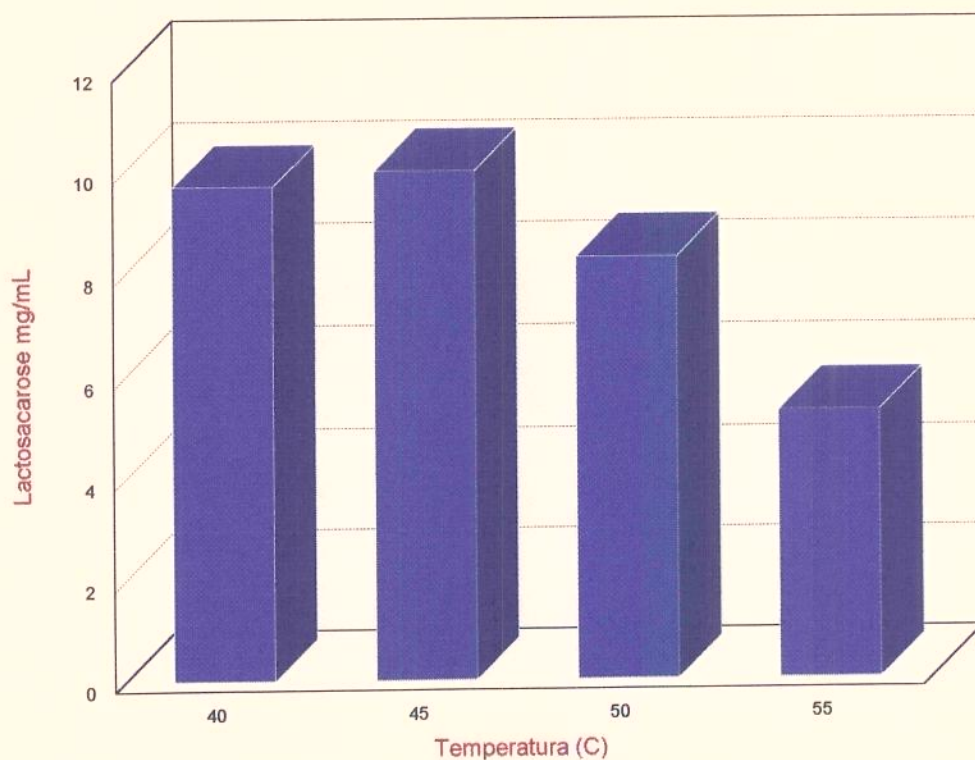


Figura 5: Efeito da Temperatura na Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Formado de 12,7% de Lactose e 8,6% de Sacarose com 2 Horas de Incubação.

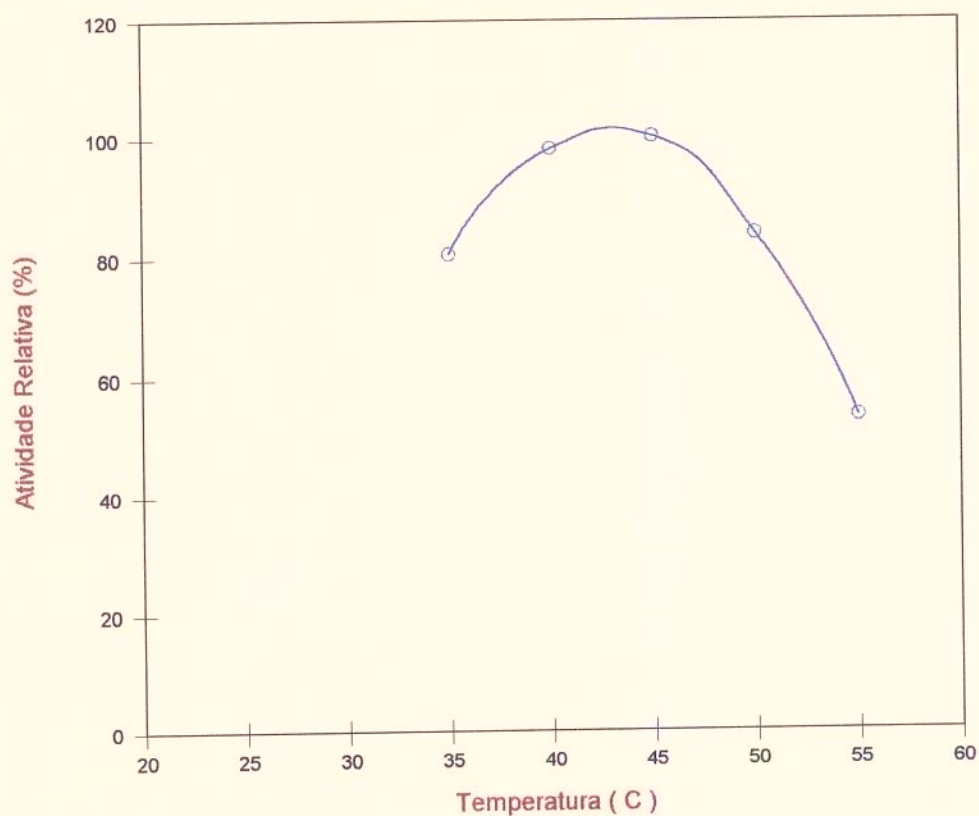


Figura 6- Efeito da Temperatura na Atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus* sp n° 417 em Sistema de Reação Formado de 10% de Lactose e 10% de Sacarose (p\p) com 1 Hora de Incubação.



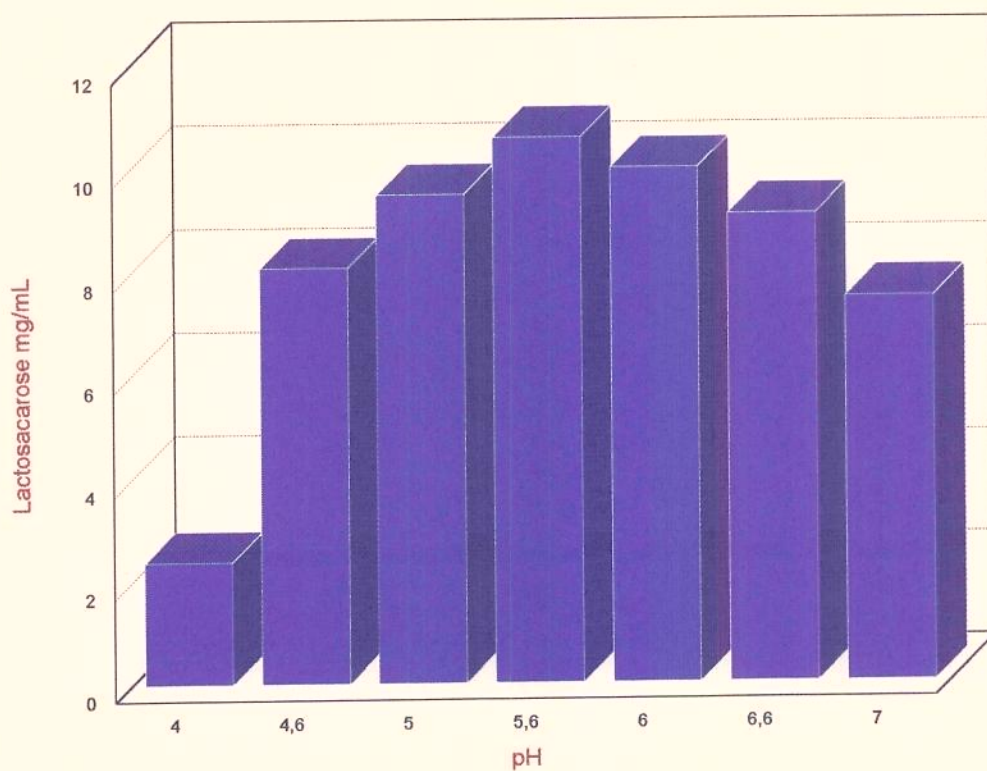


Figura 7: Efeito do pH na Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Formado de 12,7% de Lactose e 8,6% de Sacarose a 45°C por 2 Horas.

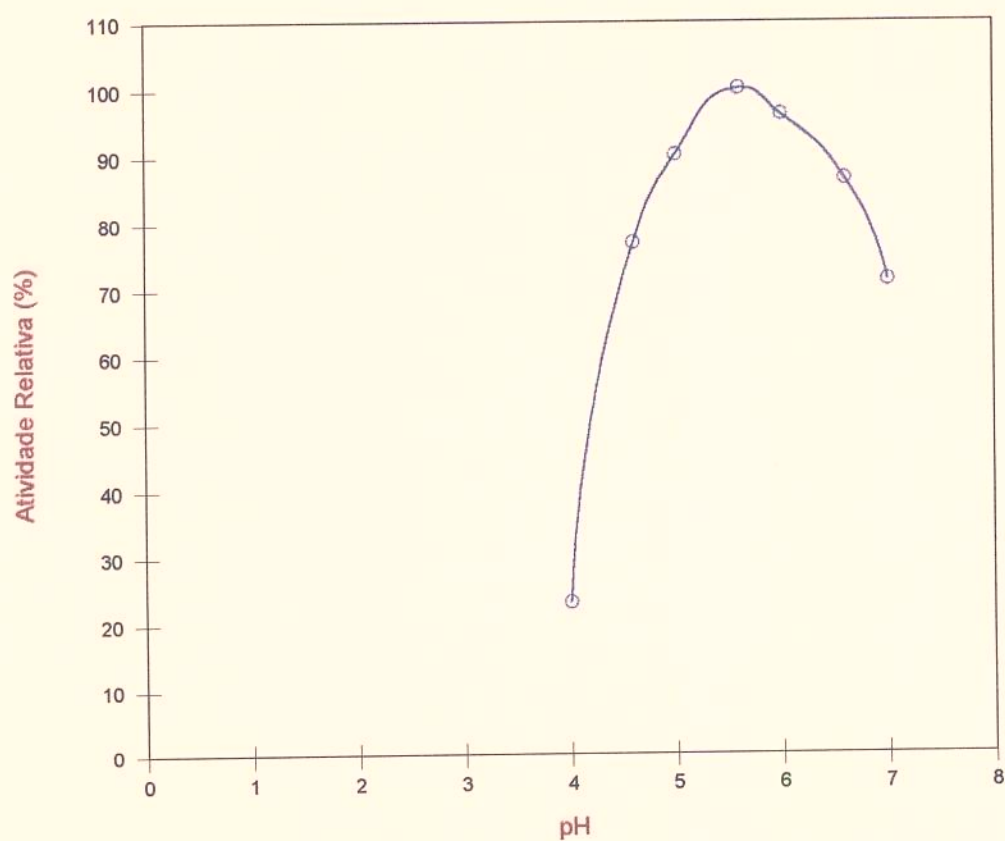


Figura 8: Efeito do pH na Atividade da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus* sp n° 417 em Sistema de Reação Composto de 10% de Lactose e 10% de Sacarose (p/p) a 45°C com 1 Hora de Incubação.

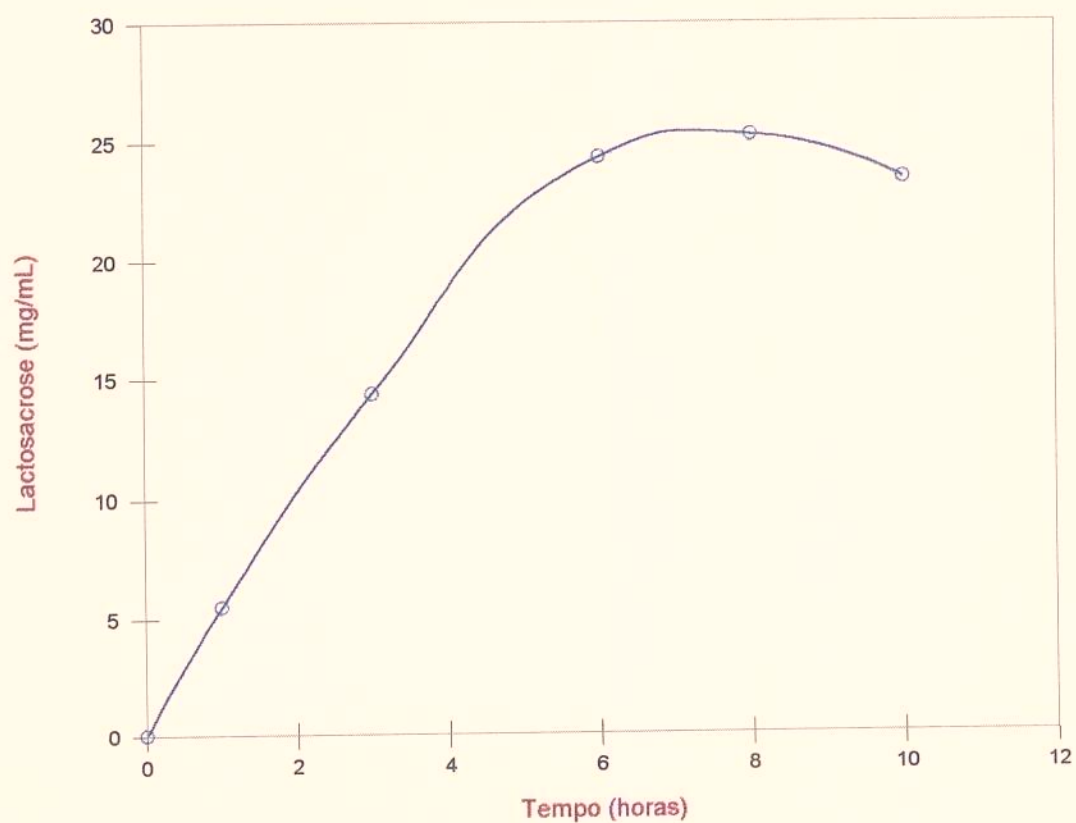


Figura 9: Cinética de Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Constituído de Solução 12,75% de Lactose e 8,6% de Sacarose Incubado a 45°C.

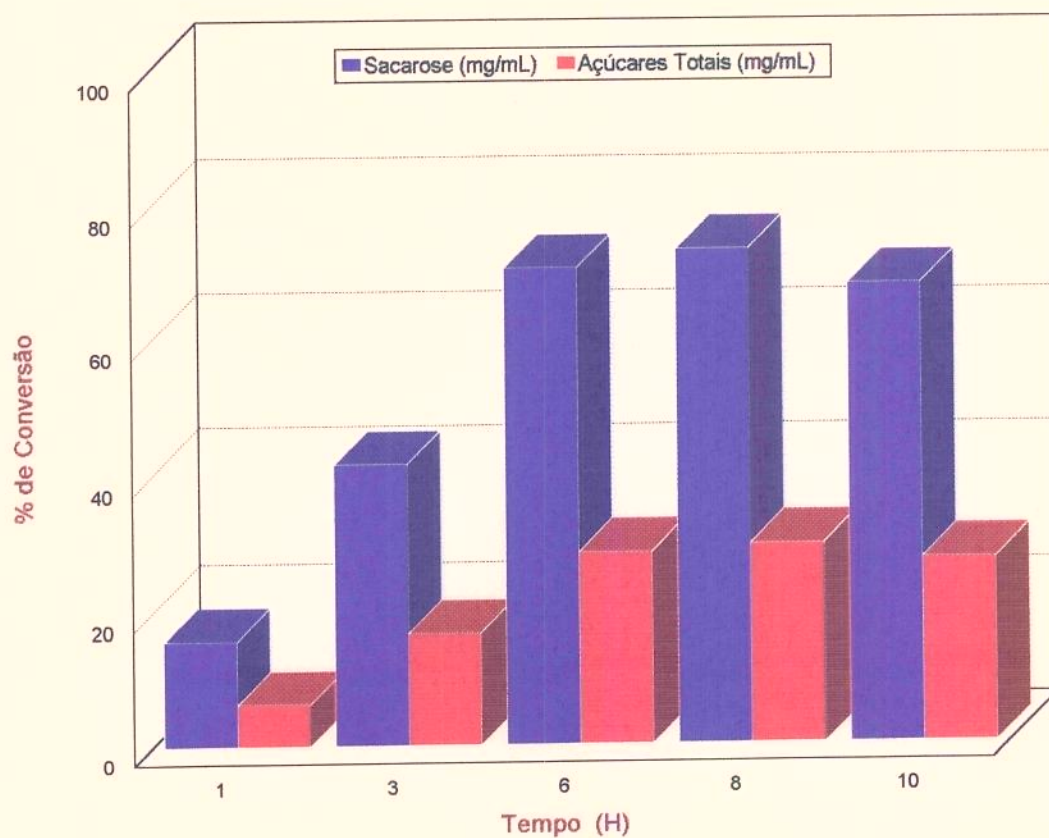


Figura 10: Porcentagem de Conversão para Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose e Açúcares Totais na Cinética de Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Contendo 12,75% de Lactose e 8,6% de Sacarose a 45°C.



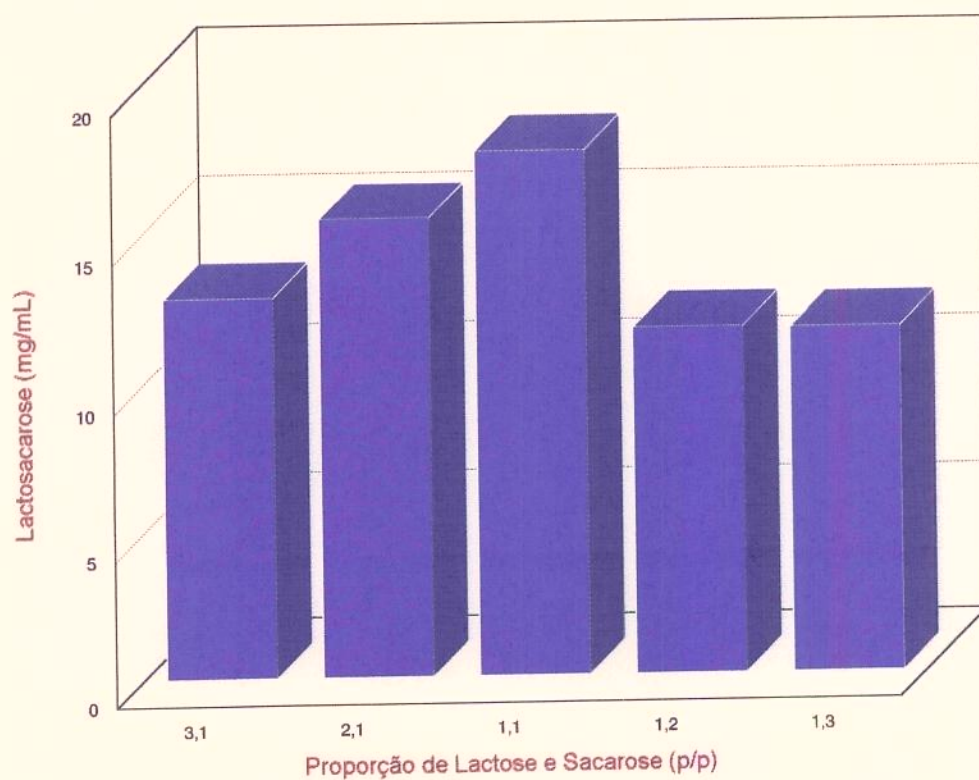


Figura 11: Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Produção de Lactosacarose em Tampão Citrato-Fosfato 20mM pH 5,6 a 45°C.

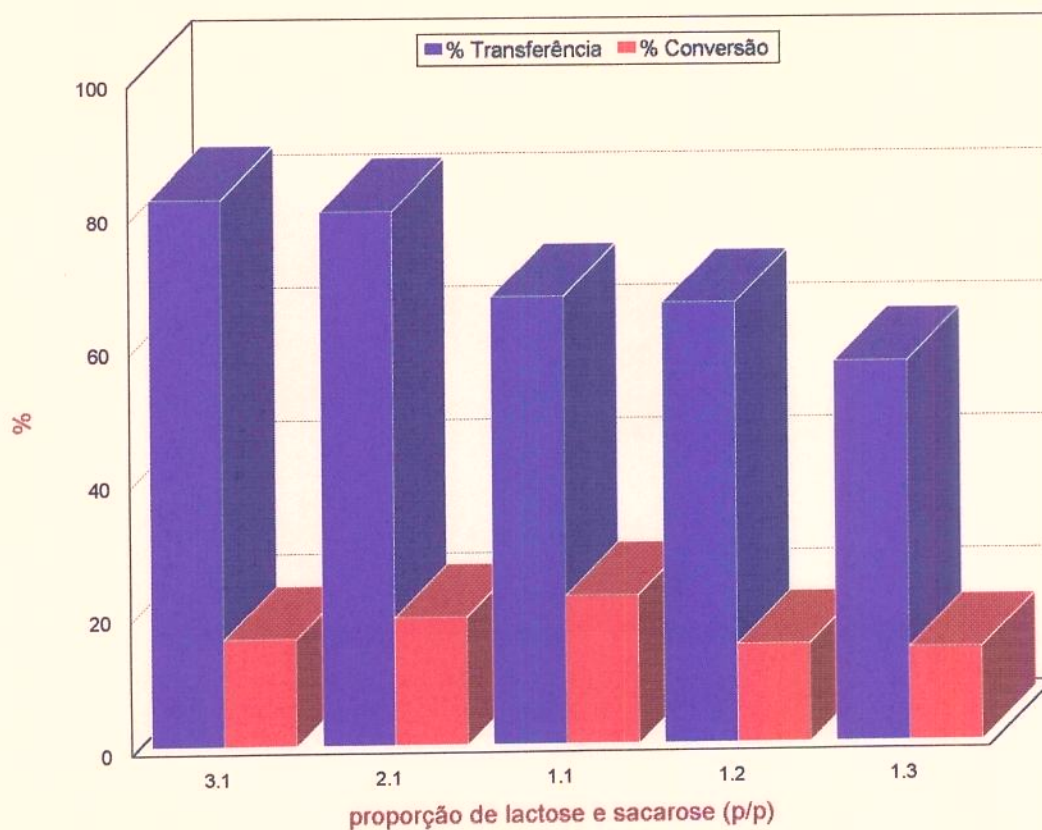


Figura 12: Efeito da Proporção de Lactose e Sacarose na Porcentagem de Conversão de Sacarose para Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose e na Porcentagem de Transfrutossilação.

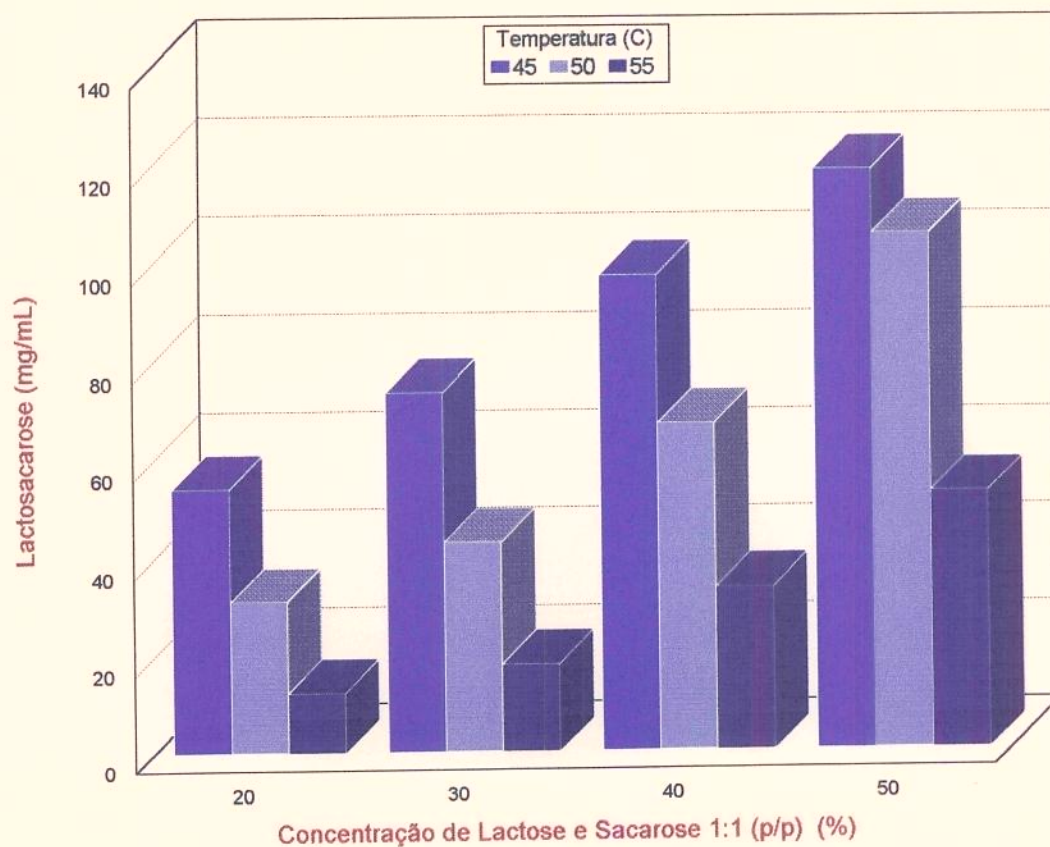


Figura 13: Efeito da Concentração de Açúcares Totais e da Temperatura na Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Contendo Lactose e Sacarose na Proporção de 1:1 (p/p).

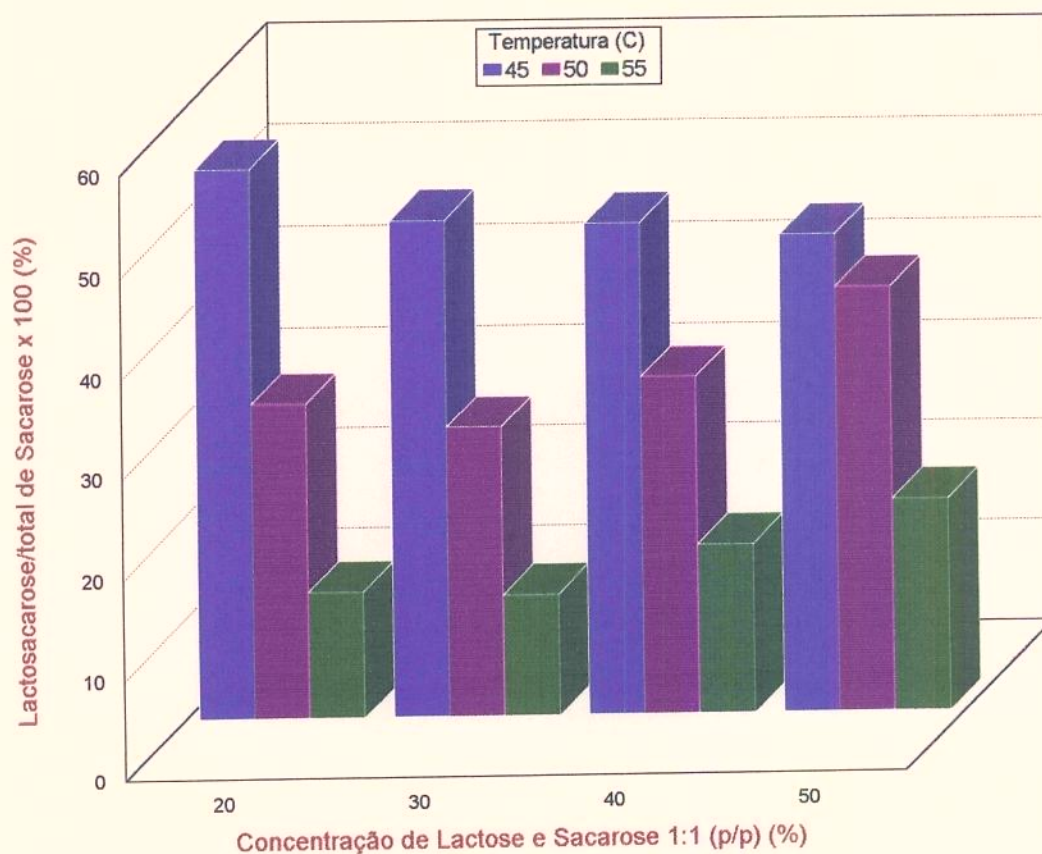


Figura 14: Efeito da Concentração de Açúcares Totais e da Temperatura na Porcentagem de Conversão de Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose.

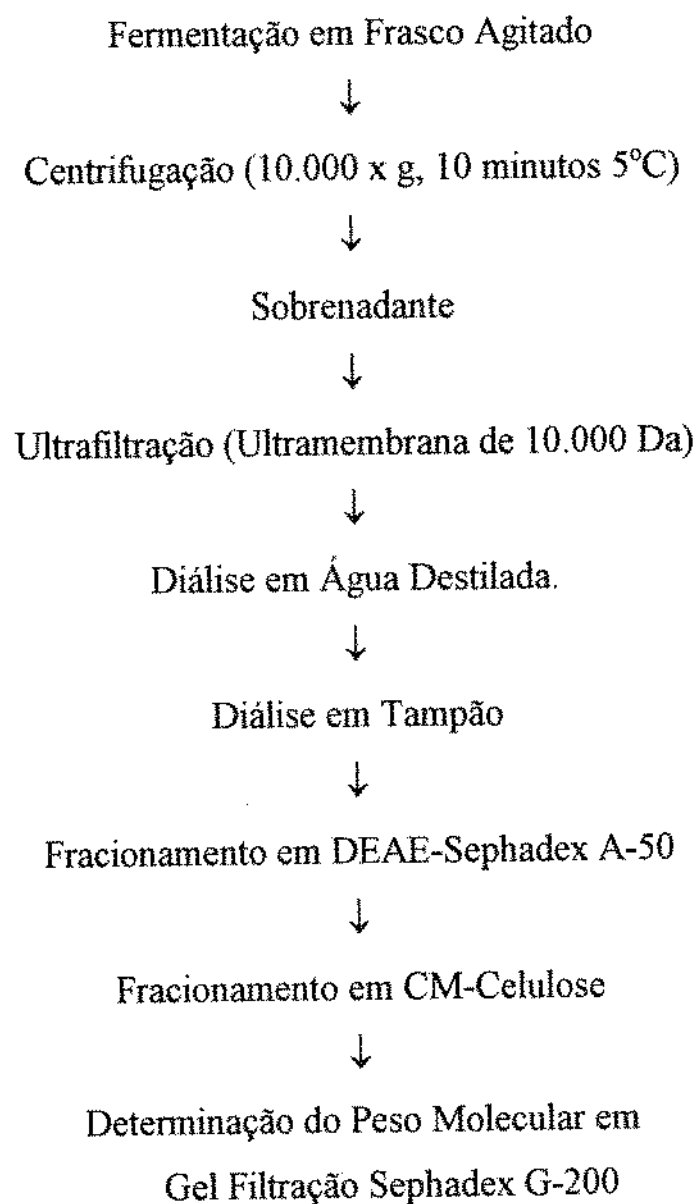


Figura 15: Fluxograma da Determinação do Peso Molecular da  $\beta$ -frutofurano-sidase de *Bacillus* sp n° 417.

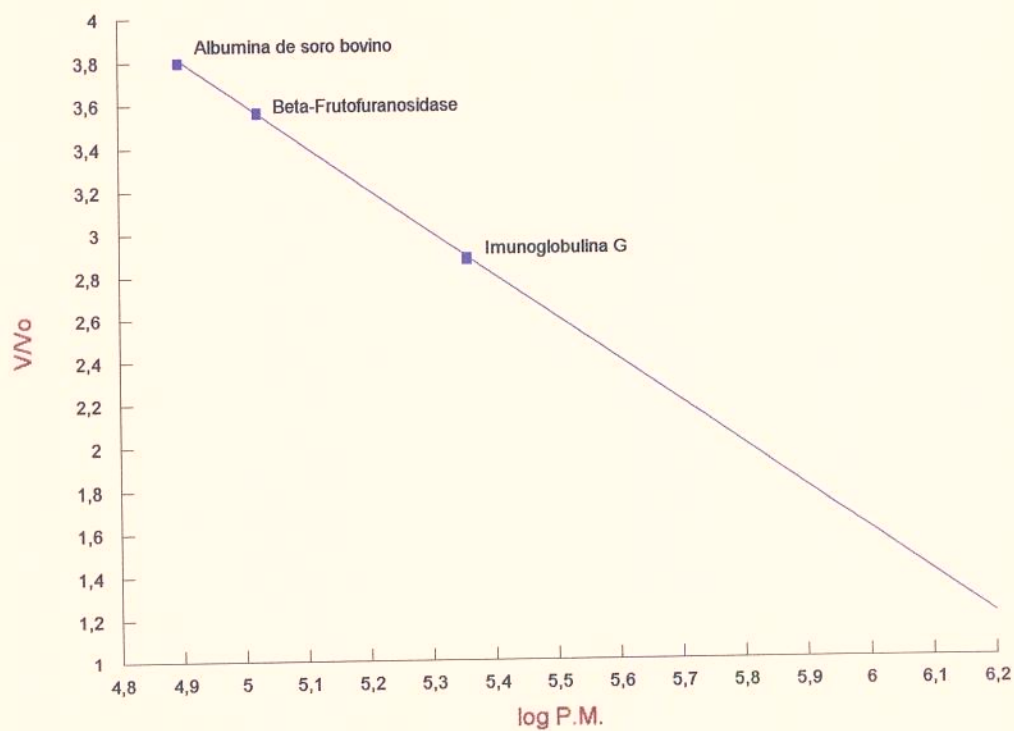


Figura 16: Relação Entre Volume de Eluição e Peso Molecular das Proteínas em Coluna de Sephadex G-200.

## 5- CONCLUSÃO:

A linhagem nº 417 selecionada e estudada como produtora de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose, entre 1341 linhagens isoladas e testadas, foi identificado como *Bacillus sp.*

A  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* nº 417 apresentou tanto atividade hidrolítica quanto de transferência e na presença do acceptor lactose catalisou a formação de lactosacarose.

A enzima bruta apresentou atividade ótima de pH e temperatura de 5,6 e 45°C, respectivamente.

Na otimização da produção de lactosacarose verificou-se que após 8 horas de reação, com 20% de concentração de sólidos totais na proporção de lactose e sacarose 1:1 (p/p) incubados a uma temperatura de 45°C em pH 5,6 obteve-se a maior produção de lactosacarose.

A  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* nº 417 apresentou peso molecular de 89.000Da, estimado através de filtração em gel Sephadex G-200.

## 6- SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO:

Estudo das condições de cultivo de *Bacillus sp* nº 417 para produção de  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose;

Purificação e caracterização bioquímica da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Bacillus sp* nº 417;

Estudo de outros parâmetros na otimização da produção da  $\beta$ -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose.



## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBON,N.; BELL,D.J.; BLANCHARD,P.H.; GROSS,D.; RUNDELL,J.T.  
Kestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **J. Chem. Soc.**,1,24-27,1953
2. ANDREWS,P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochem. J.**,96,595-605,1965.
3. BACON,J.S.D.; BELL,D.J. A new trisaccharide produced from sucrose by mould invertase. **J.Chem. Soc.**,3,2528-2530,1953.
4. BEALING,F.J.; BACON,J.S.D. The action of mould enzymes on sucrose. **Biochem. J.**,53,277-285,1953.
5. FUJITA,K; HARA,K.; HASHIMOTO,H.; KITAHATA,S. Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase I from *Arthrobacter sp.* K-1. **Agric. Biol. Chem.**,54,4,913-919,1990a.
6. ———, Transfructosilation catalyzed by  $\beta$ -fructofuranosidase I from *Arthrobacter sp.* K-1. **Agric. Biol. Chem.**,54,10,2655-2661,1990b.

7. FUJITA,K.; KITAHATA,S. Production of lactosucrose by  $\beta$ -fructofuranosidase and some of its physical properties. **Denpun Kagaku**,38,1,1-7, 1991.
8. GROSS,D.; BLANCHARD,P.H.; BELL,D.J. Neokestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **J. Chem. Soc.**,2,1727-1730, 1954.
9. HAYASHI,S.; NONOGUCHI,M.; TAKASAKI,Y.; UENO,H.; IMADA,K. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524. **J. Ind. Microbiol.**,7,251-256,1991.
10. HAYASHI, S.; MATSUZAKI,K.; TAKASAKI,Y.; UENO,H.; IMADA,K. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,8,155-159,1992a.
- 11.———. Purification and properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,8,276-279,1992b

12. HAYASHI,S.; NONOGUCHI,M.; SHIMOKAWA,Y.; TUBOUCHI,M.; TAKASAKI,Y.; IMADA,K. Purification and properties of extracellular  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. **J. Ind. Microbiol.**,9,145-147,1992c.
13. HENDERSON,R.W.; MORTON .K.; RAWLINSON,W.A. Oligosaccharide synthesis in the banana and its relationship to the transferase activity of invertase. **Biochem. J.**,72,340-344,1959.
14. HIDAKA,H.; HIRAYAMA,M.; SUMI,N. A fructoligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agric. Biol. Chem.**,52,5,1181-1187,1988.
15. HIRAYAMA,M.; SUMI,N.; HIDAKA,H. Purification and properties of a fructoligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agric. Biol. Chem.**,53,3,667-673,1989.
16. KRIEG,N.R.; HOLT,J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Willians & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 1<sup>o</sup> Ed. 1984.
17. KULP,K., Carbohydrase. In: Reed,G.. **Enzyme in Food Processing.** Second edition. London: Academic Press,1975, p53-122.

18. LUND,B.M.; WYATT,G.M. The nature reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **J. Gen. Microbiol.**, 78,331-336,1973.
19. MAC FADDIN,M.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 2º Ed. Williams & Wilkins, Baltimore,U.S.A.,1980.
20. MALLETT,M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: **Methods in Microbiology**. Vol. 1 Eds. J.R.Norris & D.W.Ribbons. Academic Press,London, 522-566, 1969.
21. PARK,Y.K.; ALMEIDA,M.M. Production of fructoligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and biotechnology**,7,331-334,1991.
22. PARK,Y.K.; IKEGAKI,M.; OLIVEIRA,I.M.A.; YIM,D.K.; MICHEL,H.K.; In: **XXIVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**,1995, Caxambu. Resumo. Caxambu,1995a. p.93.

23. PARK,Y.K.; OLIVEIRA,I.M.A.; IKEGAKI,M.; YIM,D.K. Production of fructooligosaccharides from sucrose by  $\beta$ -fructofuranosidase from new strain of yeast. In: **IFT Annual meeting**, 1995,Anaheim. Abstract. Chicago: Institute of Food Technologists,1995b. p.52.
24. PARK,Y.K.; YIM,D.K.; PASTORE,G.M.; SATO,H.H. Conversion of sucrose to kestose by yeast  $\beta$ -fructofuranosidase. In: Progress in food fermentation, 1993, Valencia. **Proceedings of the Seventh European Conference on Food Chemistry**. Valencia, 1993. p.223-228.
25. PAZUR,J.H. Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. **J. Biol. Chem.**,199,217-225,1952.
26. SCHWIMMER,S.; BEVENUE,A. Reagent for differentiation of 1,4- and1,6-linked glucosaccharides. **Science**,123,543-543,1956
27. USAMI,S.; ISHII,T.; KIRIMURA,K.; UEHARA,K.; CHEN,J. Production of  $\beta$ -fructofuranosidase showing fructose transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glaburum*). **J. Ferment. Bioeng.**, 72,4,303-305,1991.