

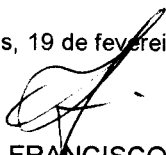
UNICAMP - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FEA - FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEA - DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Síntese de Oligossacarídeos por Inulinase de
Kluyveromyces bulgaricus

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ANDRELINA MARIA PINHEIRO SANTOS aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de fevereiro de 1998.

Campinas, 19 de fevereiro de 1998.



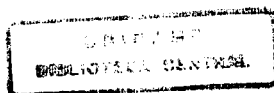
Prof. Dr. FRANCISCO M. FILHO
Presidente da Banca

Andrelina Maria Pinheiro Santos
Engenheira Química UFS/1994

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas - 1998



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

Santos, Andreina Maria Pinheiro
Sa59s Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* / Andreina Maria Pinheiro Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Oligossacarídeos. 2.Cromatografia líquida. 3.Fermentação.
I.Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

UNIDADE	BC
N.º CIP	395
TIPO	33 534
PREÇO	395p8
C	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/98
N.º CPD	

CM-00109807-1

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Orientador)



Dr. Sílvia R. Andrietta
(Membro)



Profª. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)

Profª. Dra. Maria Isabel Rodrigues
(Suplente)

Campinas, 19 de Fevereiro de 1998.

*" É assim que começa um projeto de vida:
se queremos vir a ser uma coisa que ainda
não somos, estamos dispostos a enfrentar
uma transformação. E toda
transformação vai pedir tempo e
dedicação."*

(Fr. José Carlos Correa Pedroso)

*Aos meus pais (André e Socorro) e a
Fifa (Fátima Costa), sem vocês ficaria
difícil a realização deste projeto de
vida.*

Agradecimentos

Ao Prof. Francisco Maugeri Filho, pela confiança, compreensão e orientação na realização deste trabalho.

À Prof^a. Hélia Harumi Sato e o Dr. Sílvio R. Andrietta pelas valiosas correções.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus irmãos: Edval (Beate), Socorro (Francisco), Beth, Djanira, André e Anderson, e meus sobrinhos: Bruno, Fernanda, Flávia, Gabi, Hans e Beatriz. Distantes, porém muito próximos. Saudades!!!

Aos meus primos, Toninho e Célia (Cintia, Aroldo e Aldo).

À minha irmãzita Daniella, sempre presente, muito presente!. Obrigadão!!!

Bem, amiguinha (*infantis*), como é bom compartilhar as transformações e a realização deste projeto de vida. Assim tem-se a certeza de que não somos espectadores, mas participantes (muito ativa!!!) desta vida. É apenas o começo Kity.

Que bom que você esteve por perto! Obrigada, Rose. Acima de tudo por acreditar na minha paciência!!!

Ao Hélder, não importa tão longe você esteja mas sim o quanto tão perto eu te sinto. Lembranças que sempre trazem saudades.

Ao Gabriel, pelo constante apoio e amizade. Para você não existe dificuldade que não possa ser contornada...Enfim, muito obrigada!

Ao Álvaro e Flávio, amizade deliciosa e uma experiência de vida inesquecível. Saudades!!!

À Lú (valiosa participação!!!), Eliana (um carinho especial), Henelyta, Raniere, Vanessa, Mauro, José Guilherme (Zezito), Cristiane, Ezequias e Ana como é gostoso poder contar com a amizade de vocês!!!

À Margarete, um MUITO OBRIGADA!!!

Aos colegas do laboratório: Caco, Marió, Fábria, Oscar, Suzana, Daniela, Marco.

À D. Maria (D. Mary), D. Célia, Sr. Aparecido, Sr. Alcides, Jaime, Dalila, Reinaldo, Claudia, Creuza, Geraldo, Zé e Marly, presenças marcantes. Não imaginam o quanto são importantes!!!

Catarina, Alcilene, Vera, Simone, Márcinha, Sílvia, Estevan, Marta, Eduardo (Du), Alessandra Lopes, Jaime... Fica mais fácil estar aqui quanto se tem amigos. Obrigada.

E finalmente ao *Fr. José Carlos*, pela simplicidade e clareza em mostrar o quanto é tão fácil viver a VIDA. Encerrando projetos... Sem esquecer de começar NOVOS!!!

Lia

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos Gerais	4
2.2. Adoçantes Alternativos	6
2.3. Frutooligossacarídeos	8
2.3.1. Enzimas Produtoras de Frutooligossacarídeos	10
2.3.1.3. Caracterização das Enzimas	13
2.3.1.3.1. Temperatura e pH ótimo de Atividade e Estabilidade Enzimática	14
2.3.1.3.2. Purificação da Enzima	15
2.3.2. Produção de Frutooligossacarídeos	18
2.3.3. Aplicação Industrial dos Frutooligossacarídeos	20
2.3.4. Inulinase	23
2.3.4.1. Microrganismos Produtores de Inulinases	24
2.3.4.2. Caracterização das Inulinases	25
2.3.4.2.1. Temperatura e pH de Estabilidade	25
2.3.4.2.2. Parâmetros Cinéticos	25

3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Produção da Enzima	27
3.1.1. Microrganismos	28
3.1.2. Manutenção da Cultura	28
3.1.3. Preparo do Inóculo	28
3.1.4. Fermentação	29
3.1.4.1. Recuperação da Enzima	30
3.2. Síntese dos Oligossacarídeos	31
3.2.1. Estudo do efeito do pH, Temperatura e Tempo na Síntese dos oligossacarídeos	31
3.2.2. Identificação e Quantificação das Amostras	31
3.3. Métodos Analíticos	32
3.3.1. Massa Seca	32
3.3.2. Açúcares Redutores Totais	32
3.3.3. Curva Padrão de Açúcar Redutor Total	33
3.3.4. Atividade Enzimática (Invertase e Inulinase)	33
3.3.5. Dosagem de Proteínas	34
3.3.6. Cromatografia Líquida HPLC	34
3.3.6.1. Sistema HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)	34
3.3.6.2. Preparo da Fase Móvel	35
3.3.6.3. Curva de Calibração	35
3.3.6.4. Preparo das Amostras	36
3.3.6.5. Injeção das Amostras no Sistema HPLC	36
3.3.6.6. Identificação e Quantificação das Amostras	36
3.3.7. Cromatografia Líquida. - FPLC	37
3.3.7.1. Sistema FPLC - (Fast Protein Liquid Chromatography)	37
3.3.7.2. Fase móvel	37
3.3.7.3. Preparo e Injeção das Amostras	38
3.3.7.4. Identificação das Amostras	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Seleção do Micorganismo	39
4.2. Produção da Enzima	42
4.2.1. Fermentação	42
4.2.2. Purificação da Enzima Produzida por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045	45
4.2.2.1. Extração da Enzima por Etanol	45
4.2.2.2. Purificação por Cromatografia de Troca Iônica (FPLC)	45
4.3. Caracterização da Enzima	47
4.4. Produção dos Oligossacarídeos	48
4.4.1. Curva de Calibração	48
4.4.2. Caracterização do Produto de Síntese	49
4.4.4. Reação de Hidrólise e Produção de Oligossacarídeos	49
4.4.4.1. Estudo Inicial do Efeito do pH	49
4.4.4 1. Reação a 30°C	51
4.4.4.2. Reação a 40°C	55
4.4.4.3. Reação a 50°C	57
4.4.5. Produção de Oligossacarídeos (Frutooligossacarídeos)	61
5.CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
APÊNDICE A	76
APÊNDICE B	79
APÊNDICE C	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Fontes de frutooligoassacarídeos de origem vegetal	9
Tabela 02: Valores de pH e temperaturas ótimo de atividade e faixa de estabilidade para diferentes microrganismos.	14
Tabela 03: Atividade enzimática, pH e açúcar redutor total de culturas em fermentadores após 22 horas de fermentação	39
Tabela 04: Valores de atividade enzimática referente aos três meios utilizados na fermentação.	42
Tabela 05: Fermentação em batelada simples à temperatura de 30°C e pH 3,5, aeração 0,2-0,3 vvm.....	43
Tabela 06: Purificação da inulinase por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC16045	46
Tabela 07: Purificação da β -frutosidase (invertase e inulinase) de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	47
Tabela 08: Tempo de retenção (T_R) dos padrões obtidos através da injeção no sistema de cromatografia líquida (HPLC).	48
Tabela 09: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 20 horas a 30°C.	53
Tabela 10: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 48 horas a 40°C.	55
Tabela 11: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 10 horas a 50°C.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Esquema da produção de fructooligossacarídeos (kestose, nistose, 1-fructosilnistose) por β -frutossiltransferase.....	9
Figura 02: Esquema do mecanismo de troca iônica	17
Figura 03: Esquema de produção dos fructooligossacarídeos.....	19
Figura 04: Fluxograma de produção da enzima.....	27
Figura 05: Produção de oligossacarídeos por <i>Kluyveromyces lactis</i> a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 21 horas.	40
Figura 06: Produção de oligossacarídeos por <i>Kluyveromyces fragilis</i> a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 24 horas.	41
Figura 07: Produção de oligossacarídeos por <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 24 horas.	42t
Figura 08: Fermentação em batelada simples, meio de cultura 02, pH3,5, temperatura 30° C e aeração 0,2-0,3 vvm.....	44
Figura 09: Cromatograma da purificação da enzima por cromatografia por troca iônica com coluna Q-Sepharose Fast Flow.	46
Figura 10: Produção de kestose por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> pH 3,0, na faixa de 3,0 a 5,0 a T=40°C.....	50
Figura 11: Produção de kestose por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces</i> <i>bulgaricus</i> , na faixa de pH 6,0 a 8,0 e T=40°C.....	51
Figura 12: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 4,0 a T=30°C.	53
Figura 13: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 5,0 a T=30°C.	54
Figura 14: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 6,0 a T=30°C.	54
Figura 15: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 4,0 a T=40°C.	56
Figura 16: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 5,0 a T=40°C.	56

Figura 17: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 6,0 a T=40°C.	57
Figura 18: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 4,0 a T= 50°C.	59
Figura 19: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 4,0 a T=50° C.	60
Figura 20: Síntese de oligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em pH 6,0 a T= 50°C.	60
Figura 21: Produção de Frutooligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 a T=30°C.	61
Figura 22: Produção de Frutooligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 a T=40°C.	62
Figura 23: Produção de Frutooligossacarídeos por β -fructosidase de <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC 16045 em a T= 50°C.	62

Resumo

Oligossacarídeos são compostos com grande potencial de aplicação na indústria alimentícia, e vem recebendo atenção especial de muitos pesquisadores. Em particular, tem-se os frutooligossacarídeos, que são açúcares de baixo teor calórico, não cariogênico, diabético e apresenta como principal característica estimular a produção da bifidobactéria.

Este trabalho teve como objetivo estudar as características das enzimas inulinases com atividade de transfrutossilação produzidas por diferentes microrganismos. Foram estudados o efeito do pH, da temperatura e do tempo de reação de transfrutossilação ou na produção de frutooligossacarídeos.

As enzimas foram produzidas por fermentação dos microrganismos *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*. Durante a fermentação foram analisadas atividade enzimática, pH, ART e massa seca. A purificação da enzima foi realizada através da precipitação com etanol e cromatografia em coluna de troca aniônica em resina Q-Sepharose Fast Flow em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Os produtos das sínteses foram identificados e quantificados por cromatografia líquida (HPLC).

Verificou-se que os extratos enzimáticos bruto de *K. lactis* e *K. fragilis* possuem atividade de β -frutossiltransferase e β -frutossilhidrolase e, observou-se a produção de um polímero insolúvel em água nas condições de reação. A enzima produzida por *K. bulgaricus* apresentou atividade β -frutossiltransferase e β -frutossilhidrolase, sendo que a atividade de β -frutossilhidrolase é maior do que a β -frutossiltransferase. A enzima foi caracterizada como inulinase, cuja relação S/I (S=atividade de invertase e I= atividade inulinolítica) é igual a 3,86. A purificação da enzima foi realizada através da precipitação com etanol (70% de saturação a -15°C), seguida por cromatografia de troca aniônica, obtendo-se um fator de purificação e rendimento de 1,45 e 67,77% e 9,18 e 52,09%, respectivamente.

Durante o estudo da ação de transfrutossilação verificou-se a formação de oligossacarídeos, caracterizados como frutooligossacarídeos, identificados principalmente como kestose e nistose. A reação foi conduzida numa faixa de pH 4,0 a 6,0, temperatura de 30 a 50°C , tempo de 60 horas e concentração de sacarose a 50%. Na condição de pH 6,0 e temperatura de 50°C , obteve-se uma concentração máxima de frutooligossacarídeos de 51,68 g/l (94% de kestose e 6% de nistose).

Summary

Oligosaccharides are a class of compounds with a great potential for application in the food industry, so that they have been studied by many researchers. The fructooligosaccharides which contains low calories, are noncariogenic, and suitable for diabetics and stimulate particularly the production of bifidobacteria.

The objective of this work is to study the characteristics of inulinases with transfructosilation activity produced by different microorganisms. The effect of pH, temperature and time reaction in the fructooligosaccharides production were studied.

The enzymes are produced by fermentation with the following microorganisms: *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC16045, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*. During fermentation the enzymatic activity, pH, ART and dry weight are analyzed. The enzyme purification was carried out with ethanol and FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), using Q-Sepharose Fast Flow column chromatography. The synthesis products were identified and measured by liquid chromatography (HPLC).

It was observed that the raw enzymatic material of *K. lactis* and *K. fragilis* showed β -fructosiltransferase and β -fructosilhidrolase activity, as well as the production of a water insoluble polymer. Also, the enzyme produced by *K. bulgaricus* showed of β -fructosiltransferase and β -fructosilhidrolase activity, however the β -fructosilhidrolase activity was higher than β -fructosiltransferase. The enzyme was characterized as inulinase, with ratio S/I (S=invertase activity and I=inulinase activity) equals to 3.86. The purification was carried out by precipitation with ethanol (70% of saturation at -15°C), followed by anionic exchange chromatography. Purification factors and efficiencies were respectively 1.45 and 67.77% for the first step and 9.18 and 52.09% for second one.

During the study of the transfructosilation activity it was observed that the production of oligosaccharides, which were characterized as fructooligosaccharides, identified mainly as kestose and nistose. The reaction was carried out in the following conditions: pH of 4.0-6.0, temperature of $30-50^{\circ}\text{C}$, reaction time of 60 hours and sucrose concentration of 50%. The maximum concentration of fructooligosaccharides was 51.68 g/L (94% kestose and 6% nistose), obtained at pH 6.0 and temperature at 50°C .

1. Introdução

Oligossacarídeos são carboidratos formados de 3-10 unidades de monômeros de hexoses e podem ser encontrados em produtos vegetais (frutas e legumes), em leite e mel na forma livre ou combinada. São utilizados como alimentos funcionais desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias, em função disso os oligossacarídeos são conhecidos recentemente como “probióticos”. (CRITTENDEN *et al.*, 1996).

A produção dos oligossacarídeos pode ocorrer quimicamente ou pelo uso de enzimas. Muitos são produzidos pela síntese enzimática a partir de açúcares simples pela reação de transglicosilação, ou pelo controle da degradação enzimática de polissacarídeos de plantas ou de origem microbiológica.

Atualmente existem vários tipos de oligossacarídeos produzidos comercialmente, podendo-se citar como exemplos: os galacto-oligossacarídeos, a lactosacarose, a palatinose e os frutooligossacarídeos. Os frutooligossacarídeos representam um dos principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, em termos de produção. Normalmente, são produzidos por dois processos, que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro processo a sacarose é utilizada como substrato, sendo obtido como produto, frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades frutossil com ligações β -(2-1), com um resíduo α -D-glicosil terminal, conhecidos como kestose, nistose e 1-fructossilnistose. O segundo processo constitui-se na hidrólise enzimática da inulina, no qual são produzidos frutooligossacarídeos de cadeia longa (CRITTENDEN *et al.*, 1996).

Os frutooligossacarídeos são produzidos a partir da sacarose, através da transfrutossilação, catalisada pela β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosídeo frutofuranosidase E.C.3.2.1.26) ou pela β -frutossiltransferase (β -D-frutofuranosídeo frutossiltransferase E.C. 2.4.1.9) de microrganismos e plantas (CHANG *et al.*,1994).

Pesquisas recentes indicaram que os frutooligossacarídeos tem efeito favorável no metabolismo de carboidratos e lipídeos, sendo estes semelhantes ao efeito da fibra na dieta. Também pode-se citar outros benefícios associados a assimilação de frutooligossacarídeos pela microflora intestinal, tais como, diminuição do pH intestinal, restrição no crescimento de bactérias patogênicas e putrefativas, redução da constipação intestinal e decréscimo nos níveis triglicerídeos e colesterol do soro sanguíneo (OKU *et al.*,1988; MODLER *et al.*,1996).

Os frutooligossacarídeos, conhecidos comercialmente no Japão como "neosugar G" e "neosugar P", são produzidos a partir da transferência de radicais frutosila à sacarose pela enzima β -frutossiltransferase microbiana obtida de *Aspergillus oryzae* (PAZUR, 1952; CHANG *et al.*,1994), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1980; HAYASHI *et al.*,1989; LEE *et al.*, 1992), *Aspergillus niger* (HIDAKA *et al.*,1988; PARK & ALMEIDA, 1994) e *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et al.*,1992; DUAN *et al.*,1993; CHEN, 1996).

No Japão, os frutooligossacarídeos são considerados alimentos e não ingredientes de alimentos, sendo encontrados em mais de 500 produtos alimentícios, resultando num consumo diário significativo, cuja média é estimada em 13,7 mg/kg/dia, considerando-se, somente os frutooligossacarídeos de origem natural. A quantidade de frutooligossacarídeos considerada eficaz ou necessária na dieta de um adulto é relativamente grande cerca de 5 gramas/dia (SPIEGEL *et al.*,1994).

Os frutooligossacarídeos representam de 20 a 40% do poder edulcorante da sacarose, são de baixo valor calórico, não cariogênico, estimulantes da flora microbiana intestinal, não digeríveis no intestino delgado, sendo seletivamente utilizados pelas bactérias do cólon, e especialmente pelas bifidobactérias que hidrolisam estes açúcares. Pertencem a categoria de alimentos funcionais que estimulam o aumento da população de bifidobactéria do cólon que é numérica e fisiologicamente o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal, responsáveis pela supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas existentes no intestino grosso, restringindo a formação de toxinas e outras substâncias nocivas ao ser humano. Outros efeitos relacionados a ação das bifidobactérias incluem a produção de vitaminas do complexo B, indução dos níveis de colesterol e triglicerídeos, além de atuarem como imunomoduladoras (OLIVEIRA, 1997).

Alimentos com funções fisiológicas ou bio-modeladoras, além das propriedades nutricionais e sensoriais, vem sendo uma preocupação de países como o Japão, EUA e da Comunidade Européia, pois atuam na prevenção de patologias, e portanto, na promoção do bem-estar do indivíduo. Observa-se um interesse industrial na produção e aplicação de fatores bifidogênicos, porém em alguns casos o marketing se sobrepõe às pesquisas tornando-se necessário pesquisas básicas e aplicadas para que se atinja uma credibilidade maior com relação a esses produtos (OLIVEIRA, 1997).

Este trabalho teve como objetivo o estudo da atividade β -frutossiltransferase da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces fragilis* ATCC 16045, e a produção de oligossacarídeos sob diferentes condições de pH, temperatura e tempo de síntese.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aspectos Gerais

Desde a introdução dos açúcares refinados na dieta alimentar, os adoçantes alternativos tiveram uma influência bastante significativa sob o aspecto nutricional. Entretanto, não foi apenas o paladar doce que transformou o açúcar em um ingrediente desejável nos alimentos, mas sim seus atributos de interesse proveitosos, como por exemplo a preservação dos alimentos a altas concentrações. O açúcar é uma substância calórica, tendo uma influência específica no metabolismo humano nas dietas alimentares. Na maioria da população a sacarose e glicose são açúcares facilmente metabolizados, e utilizados como fonte de energia. Para cerca de 2% da população a glicose não é absorvida pelas células, como consequência o consumo destes açúcares possui um efeito tóxico. Tal fato não ocorre com os adoçantes alternativos, que não são metabolizados pelo organismo podendo ser consumido por diabéticos (GRENBY,1979).

Os açúcares são ingredientes alimentícios multifuncionais. Além de adoçantes, são agentes espessantes, umectantes, conservantes, solubilizantes, atuam modificando a textura, fornecendo volume, realçando aroma e sabor, modificando a aparência, podem ainda atuar como matéria-prima fermentescível, controladores do ponto de congelamento e regulam a estrutura e formação de cristais (CÂNDIDO & CAMPOS, 1996).

Além da facilidade de absorção pelo organismo humano, o açúcar é bastante cariogênico. De acordo com a literatura, a sacarose e a glicose são as principais responsáveis pela ocorrência da cárie, pois são facilmente convertidas pelas bactérias orais. Por outro lado, a frutose apresenta um teor de

cariogenicidade menor quando comparada com estes dois açúcares. Desta forma, as pesquisas na área de adoçantes alternativos com alto teor de frutose tornam-se bastantes atrativas (SCHNEIDER, 1996).

A sacarose, o primeiro adoçante nutritivo obtido a partir da cana-de-açúcar ou de beterraba, é o mais importante dos açúcares. Apesar das vantagens apresentadas pela sacarose, pode-se citar alguns aspectos negativos atribuído a este açúcar natural, tais como a cariogenicidade, a obesidade, se consumido em excesso, a contribuição para arterioesclerose e a inconveniência do uso para diabéticos (VANDAMME & DERYCKE,1983).

Como uma nova opção de adoçante natural, a frutose apresenta inúmeras vantagens em relação à sacarose. Além de ser um açúcar pouco cariogênico, a frutose, apresenta uma maior tolerância pelos diabéticos quando comparada com a sacarose e glicose. Sabe-se que a concentrações limitadas, a absorção da frutose realizada pelo organismo não necessita da insulina (SCHNEIDER, 1996). Segundo VANDAMME & DERYCKE(1983), o interesse que a frutose desperta como adoçante, é atribuído principalmente as suas propriedades organolépticas. Nas indústrias o xarope de frutose confere uma melhor qualidade aos alimentos, menor tendência a cristalização, maior estabilidade microbiológica e uma menor higroscopicidade

O surgimento dos adoçantes alternativos vem atender as novas exigências do mercado consumidor, no que diz respeito à aquisição de produtos de baixa caloria, para diabéticos, e anticariogênico. De acordo com CÂNDIDO & CAMPOS (1996), para que um adoçante possa ser considerado como ideal para o consumo, deve apresentar as seguintes características:

- Poder adoçante igual ou superior ao da sacarose
- Disponibilidade comercial
- Custo compatível ao da sacarose (baixo custo/ unidade de doçura)
- Compatibilidade química com aditivos, como aromatizantes e corantes

- Inerte aos demais componentes dos alimentos
- Incolor
- Fácil solubilidade
- Estabilidade química e térmica
- Isento de toxicidade
- Calorias reduzidas (menor que 2 kcal/g) ou ser isento de calorias
- Não promover diarreia osmótica
- Não promover cáries
- Permitir níveis irrestritos de utilização
- Proporcionar as propriedades funcionais, qualidade de doçura, sabor residual e perfil de doçura em função do tempo semelhante ao da sacarose, sem gosto residual

O grau de doçura dos adoçantes alternativos é medido geralmente por comparação com o padrão, a sacarose. A doçura depende também de fatores como concentração do adoçante, temperatura, pH e sensibilidade do paladar.

2.2. Adoçantes Alternativos

A descoberta e o uso dos adoçantes alternativos data deste último século. Um dos primeiros adoçantes a surgirem no mercado, foi a sacarina descoberta em 1879 por RENSEN & FAHLBERG, apresentando um grau de doçura na faixa de 240 a 350 vezes maior que a sacarose, e o ciclamato, sendo 30 vezes mais doce que a sacarose, foi descoberto em 1937 por ANDRIETH & SVEDA.

Estudos contínuos em pesquisas na produção de adoçantes alternativos que não fossem obtidos por via química, mas enzimaticamente, levaram a produção de adoçantes alternativos já produzidos comercialmente. Podendo ser citado como exemplos a palatinose ou isomaltulose, obtida a partir da conversão enzimática da sacarose (MODLER, 1994).

Palatinose ou isomaltulose, produzido pela Mitsui Sugar Company, mantém o sabor dos alimentos inalterados apresentando como características: baixa caloria, doçura em torno de 42% maior do que a sacarose, baixa cariogenicidade, não sofre alteração com a temperatura, solubilidade à temperatura ambiente de aproximadamente a metade da sacarose e não apresenta propriedades higroscópicas. São considerados como um dos dissacarídeos mais importantes, e seu consumo tem aumentado consideravelmente no Japão e outros países como um forte substituto do açúcar (CRITTENDEN *et al.*, 1996).

Recentemente surgiu no mercado um novo tipo de adoçante alternativo, conhecido como frutooligossacarídeo, que corresponde a uma classe de açúcares constituídos de duas a quatro moléculas de frutose ligadas a uma molécula de sacarose com ligações do tipo β -(2 $\rightarrow$ 1). Seus principais componentes são 1-kestose [(O- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil- α -D-glicopiranosídeo)] ou GF₂, nistose [(O- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil- α -D-glicopiranosídeo)] ou GF₃ e 1-frutossilnistose (O- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil-(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-frutofuranosil- α -D-glicopiranosídeo)] ou GF₄. Os frutooligossacarídeos são conhecidos comercialmente como “neosugar”, desenvolvido pela Meiji Seika Kaisha Ltda, a partir de um processo microbiológico, tendo como substrato a sacarose pela ação da enzima β -frutossiltransferase (HIDAKA *et al.*, 1988).

Comercialmente no Japão, existem dois tipos de “neosugar”, o “neosugar G” e o “neosugar P”. O “neosugar G” é obtido pela reação enzimática a partir da transfrutosilação da sacarose, seguida de um processo de descoloração e dessalinização apresentando uma composição final de 35% de glicose e frutose, 10% de sacarose e 55% de frutooligossacarídeos (GF₂=25%, GF₃=25% e GF₄=5%). O “neosugar P” é produzido a partir do neosugar G, pela remoção dos monossacarídeos e dissacarídeos, resultando em 95% de frutooligossacarídeos (GF₂=45%, GF₃=45% e GF₄=5%). Comparando o poder adoçante do neosugar G

e neosugar P, foi observado que o grau de doçura fica em torno de 60% e 30%, respectivamente. Verificou-se também que os mesmos são bastantes estáveis em pH neutro e temperaturas acima de 140°C (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991).

O grande interesse que existe nos frutooligossacarídeos como adoçantes alternativos, não é apenas pelas suas propriedades específicas de baixa cariogenicidade, baixa caloria e diabético, mas também no fato de ser uma substância bifidogênica, o qual promove o crescimento da bifidobactéria. A bifidobactéria, microrganismo anaeróbico não formador de esporo gram-positivo, ocorre naturalmente no organismo humano trazendo uma série de benefícios para a saúde.

2.3. Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são açúcares formados de 1 a 3 moléculas de frutose ligadas a uma molécula de sacarose na posição β -(2 $\rightarrow$ 1). Apresentam propriedades físicas e fisiológicas que o tornam um composto de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano, passando através do intestino delgado sem serem absorvidos e vão direto para o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microflora intestinal (MITSOUKA, 1990).

Normalmente podem ser obtidos por fontes de origem vegetal, como mostrado na Tabela 01 ou pela ação da enzima β -frutotransferase sobre a sacarose (Figura 01). Este processo foi desenvolvido pela companhia japonesa Meiji Seika com o nome de “neosugar” que corresponde a uma mistura de sacarose, glicose, frutose e frutooligossacarídeos (kestose, nistose, 1-frutotransferase) (SCHIWEK et al., 1995).

Tabela 01: Fontes De Frutooligoassacarídeos De Origem Vegetal.

PLANTA	TEOR	
	Base Fresca (%)	Base seca (%)
Chicória	24,0	73,6
Alcachofra de Jerusalém	22,0	74,0
Dália	13,0	72,0
Cebola	2,0-5,0	70,0
Alho	5,0-10,0	50,0
Alho porro	2,0-5,0	70,0
trigo	0,8	1,0

Fonte: MODLER,1994

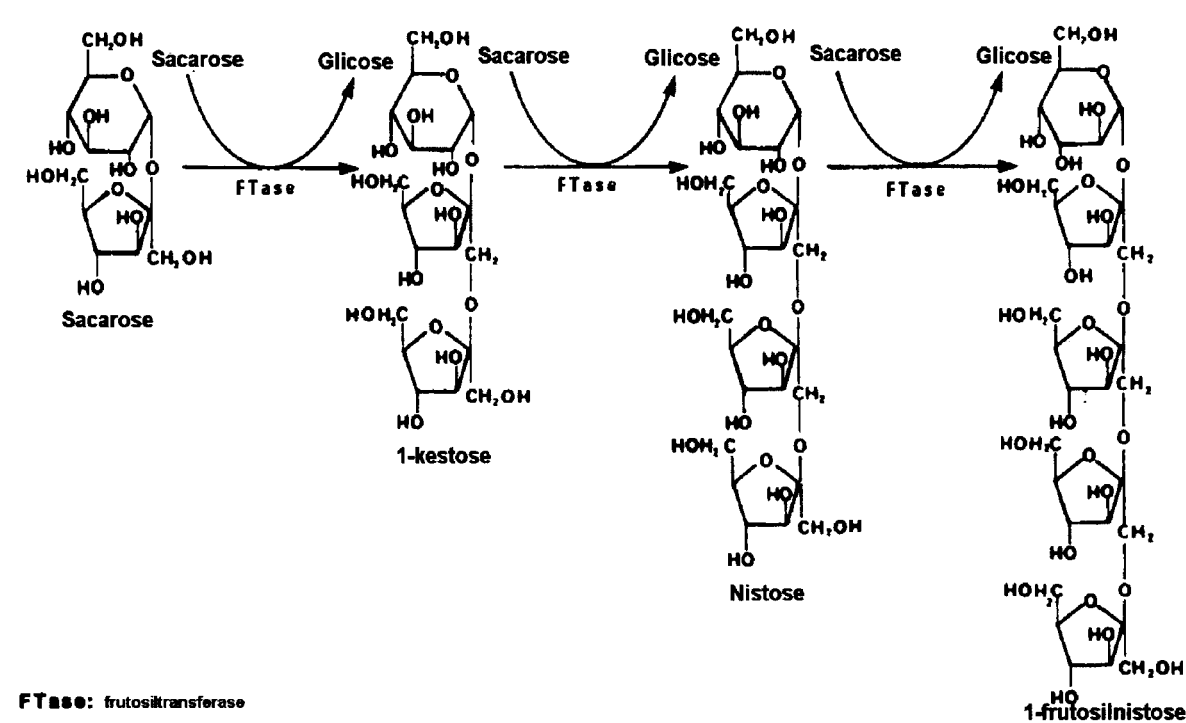


Figura 01: Esquema da Produção de frutooligoassacarídeos (kestose, nistose, 1-frutossilnistose) por β -frutossiltransferase.

A Figura 01 mostra o esquema da produção enzimática de frutooligossacarídeos, onde a enzima transfere resíduo frutossil da molécula da sacarose doadora para molécula da sacarose receptora. A reação ocorre normalmente a uma temperatura de 50 a 60°C, com uma concentração de sacarose a 60%(w/v), pH na faixa de 5,5 a 6,0. As características mais importantes deste açúcar alternativo são:

- poder adoçante
- não metabolizável pelo organismo humano
- atuação como fibras solúveis
- utilizável seletivamente pelas bifidobactérias que inibem a produção de substâncias putrefativas

2.3.1. Enzimas Produtoras de Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos de origem microbiana são obtidos a partir da enzima β -frutofuranosidase (β -D-fructofuranosídeo fructohidrolase, E.C. 3.2.1.26), ou pela enzima β -frutossiltransferase (β -D-fructofuranosídeo frutossiltransferase, E.C.2.4.1.9) (OLIVEIRA,1996).

Um dos primeiros trabalhos que se tem conhecimento sobre uma enzima que apresentava ação de transfrutosilação de *Aspergillus niger*, foi publicado em 1952 por PAZUR, onde demonstrou-se a ação de transfrutosidase em duas etapas. Na primeira etapa, a enzima colidia com a molécula de substrato, formando um complexo frutossil-enzima (FR-E) relativamente estável. Na segunda etapa, o complexo frutossil-enzima (FR-E) se aproximava da molécula do co-substrato ocorrendo a transferência de unidades de frutose ao co-substrato, com a dissociação de novos oligossacarídeos do complexo.

No mecanismo de transferência de frutose, admite-se a existência de dois sítios ativos sobre a β -frutossiltransferase para a sacarose. Um dos sítios agiria como doador e o outro como aceptor de unidades de frutossil. De acordo com o modelo proposto, a frutose seria transferida do sítio doador para a parte da frutose existente na molécula da sacarose para seu sítio aceptor formando desta maneira kestose (GF_2). Em seguida, o resíduo de frutose proveniente da sacarose doadora seria transferida para uma molécula de sacarose aceptora ou uma glucifrutosana (frutooligossacarídeos) e não mais para a água. Desta forma, o nucleotídeo atuaria como ponte de ligação entre os dois sítios ativos, agindo como um mecanismo regulador para ativar a enzima. Neste processo haveria dependência apenas do tipo de carboidrato disponível no meio para suprir a energia necessária ao organismo (GUPTA & BHATIA, 1980).

A transferência de resíduos de frutossil para a sacarose com uma concentração de 50% (w/v), catalisada pela enzima β -frutossiltransferase de *Aspergillus niger* ATCC 20611, favoreceu um aumento na produção de kestose e nistose. Constatou-se que a enzima β -frutossiltransferase em altas concentrações de sacarose favorece a ação de transfrutossilção, onde a conversão para frutooligossacarídeos ocorre rapidamente atingindo um total de 60% de carboidratos formados após um período de 24 horas. Transcorrido este tempo de incubação, a produção de kestose começou a diminuir. Concomitantemente, a concentração de nistose e 1-frutossilnistose aumentaram, confirmando assim o modelo proposto por JUNG *et al.* (1989) no qual a produção de frutooligossacarídeos ocorre de uma forma desproporcional ($GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$).

A β -frutofuranosidase (β -D-fructofuranosídeo fructohidrolase, E.C. 3.2.1.26) é uma enzima presente em plantas, animais e microrganismos que possui ação hidrolítica e ação de transfrutossilção a partir da sacarose. A especificidade do aceptor para a reação de transfrutossilção e as estruturas dos produtos transfrutossilados variam dependendo da fonte da enzima. Os doadores e aceptores dos grupos frutossila podem ser sacarose ou outros

frutooligossacarídeos, rafinose e melezitose. É essencial que nestes grupos doador/aceptor, a ligação entre a glicose e frutose seja do tipo $\alpha 1-2\beta$ (FUJITA *et al.*, 1991, FUJITA *et al.*, 1994; DUAN *et al.*, 1994).

A ação hidrolítica da β -frutofuranosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080, foi estudada através da liberação de açúcar redutor, usando como substrato sacarose, rafinose, estaquiose e melezitose a 20%. A enzima não apresentou atividade na presença de melezitose. A ação de hidrólise da enzima β -frutofuranosidase, de *Arthrobacter sp* k-1 foi constatada na presença de sacarose, erlose, rafinose, frutoxilósídeo, neokestose, 1-kestose, nistose, turanose, lactosilfuranosídeo e estaquiose, a 10 mM, entretanto a ação hidrolítica não foi favorecida na presença de 1-kestose, nistose e turanose. Já a β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* hidrolisou 1-kestose mais rapidamente do que a rafinose, diferindo da enzima de *Arthrobacter sp* K-1. Desta forma, foi verificado que a especificidade de uma enzima e sua velocidade de reação diferem uma das outras, dependendo da origem da enzima (CHANG *et al.*, 1994; FUJITA *et al.* 1990b).

Analizando-se o comportamento enzimático da β -frutofuranosidase obtida do *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans*, verificou-se que são bastantes similares. Durante a reação de síntese dos frutooligossacarídeos, a enzima catalisou a transferência de um resíduo de frutossil para um aceptor com uma ligação 2- β -D-frutofuranosidase, como por exemplo, sacarose, 1-kestose ou nistose, obtendo como produto de reação os frutooligossacarídeos (1-kestose e nistose) (STRAATHOF *et al.*, 1986).

A enzima β -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* k-1 catalisou a hidrólise e a transferência da sacarose para produzir 1-kestose como produto principal. Entretanto 1-kestose, nistose e sacarose não foram considerados aceptores para resíduos de frutossila de *Arthrobacter sp* K-1. As β -frutofuranosidasas de *Aspergillus awamori* e *Penicillium oxalium* produziram dois tipos de trissacarídeos, 1-kestose e neokestose. Concluindo-se que diferentes enzimas apresentam

especificidades diferentes para os grupos aceptores (OH-1^{F} , OH-6^{F} e OH-6^{G}) da sacarose, produzindo 1-kestose, 6-kestose e neokestose, respectivamente. Segundo, HIRAYAMA *et al.* (1989), durante a reação de síntese, existe competição entre a água e o substrato para serem aceptores do resíduo de frutose, e o aumento da concentração de sacarose favorece uma maior produção de frutooligossacarídeos (FUJITA *et al.*, 1990a; DUAN *et al.*, 1993).

As enzimas β -frutofuranosidases possuem tanto ação de transfrutoseilação (U_t) e ação hidrolítica (U_h). A ação de transferência é característica de cada linhagem produtora. A produtividade enzimática foi definida como o crescimento celular multiplicado pela atividade específica correspondente. Para se obter uma produção eficiente de frutooligossacarídeos, é importante que o microrganismo apresente uma alta proporção U_t/U_h e alta produtividade enzimática. Pelos dados experimentais o *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* são linhagens que melhor apresentaram os parâmetros U_t e U_h (JUNG *et al.*, 1987 e 1989, HIRAYAMA *et al.*, 1989; HIDAKA & HIRAYAMA 1991, LEE *et al.* 1992; PARK & ALMEIDA, 1991).

2.3.1.3. Caracterização das Enzimas

A caracterização das enzimas no que se refere a temperaturas e pH ótimos de atividade e estabilidade, purificação e efeitos de íons metálicos na atividade enzimática demonstraram variação em função da linhagem microbiana. Podemos citar como fontes de enzima β -frutofuranosidase com alta atividade de transfrutoseilação os microrganismos: *Penicillium frequentans* (USAMI *et al.*, 1991), *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIDAKA *et al.*, 1988), *Aspergillus sp* 20524 (HAYASHI *et al.*, 1989, 1990, 1991c; JUNG *et al.*, 1993; YUN *et al.*, 1990, 1992a), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1980), *Arthrobacter sp* (FUJITA *et al.*, 1990a,b) e *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et al.*, 1993).

2.3.1.3.1. Temperatura e pH e de Atividade e Estabilidade

Na Tabela 02 encontram-se exemplificados a melhor faixa de pH e temperatura de atividade e estabilidade da enzima β -frutofuranosidase e β -frutossiltransferase de várias linhagens de microrganismos. Os valores foram estimados incubando-se a enzima a diferentes valores de pH e temperaturas.

Tabela 02: Valores de pH e temperturas ótimos e faixa de estabilidade para diferentes microrganismos.

Micorganismo	Tipo de Enzima	pH _{ótimo}	T _{ótimo} °C	pH _{estabilidade}	T _{estabilidade} °C	Referências
<i>Asp. pullulans</i> KFCC 10245	β -FFase extra/bruta	5,5	50			JUNG <i>et. al.</i> , 1989
<i>Aureobasidium</i> sp 20245	β -FTase intra/bruta	5,0-6,0	50	5,0-6,0	< 50	HAYASHI <i>et. al.</i> , 1992a
<i>Asp. japonicus</i> MU-2	β -FFase bruta	5,0-5,5	60-65	4,0-9,0	40	HAYASHI <i>et. al.</i> , 1992a
<i>Asp. niger</i> ATCC20611	β -FFase intra/pura	5,0-6,0	50-60	4,5-10		HAYASHI <i>et. al.</i> 1992c, 1993
<i>Asp. japonicus</i> TIT-KJI	β -FFase intra/pura	5,4	60			DUAN <i>et. al.</i> , 1993
<i>Aureobasidium</i> sp ATCC 20524	β -FFase			4,0-7,0	40-50	HAYASHI <i>et. al.</i> , 1992
<i>Arthrobacter</i> sp K-1	β -FFase extra/pura	6,5-6,8	55	5,5-10	40	FUJITA <i>et al.</i> , 1990c

2.3.1.3.2. Purificação da Enzima

Para purificação das enzimas, normalmente utiliza-se uma sequência de etapas de separação que resultará em um grau elevado de pureza e rendimento. O objetivo da purificação é aumentar a pureza ou afinidade biológica da proteína, eliminando-se as proteínas inativas e elevando o rendimento desta proteína ao máximo (LEHNINGER, 1977).

Diferentes processos são utilizados na purificação, sendo que em um deles, após a extração, o caldo enzimático ainda possui proteínas inativas que são indesejáveis e interferem na atividade enzimática. No caldo pré-purificado o teor de enzimas de interesse é em torno de 0,1-50%. Observa-se que a um determinado pH, as proteínas podem diferir quanto a (WHITAKER, 1996):

- solubilidade
- distribuição de carga
- densidade de carga
- hidratação
- tipo
- forma
- densidade (volume específico)
- grupos reativos específicos
- estabilidade relativa

Várias técnicas são utilizadas nas etapas preliminares de purificação de proteínas. Uma delas é a precipitação de proteínas pelo ponto isoelétrico em que o pH da mistura de proteínas é ajustado para o ponto isoelétrico de um de seus componentes. Nesta técnica a maior parte da proteína ou a totalidade daquele componente irá se precipitar, deixando em solução as proteínas cujo ponto isoelétrico se situa acima ou abaixo daquele pH. Outra técnica é a precipitação

com solventes orgânicos, por exemplo etanol. Ao utilizar solventes orgânicos, alguns cuidados devem ser levados em conta para evitar que a proteína sofra desnaturação. A adição do solvente deve ser lenta e é importante que o solvente esteja a -15°C (WHITAKER, 1996).

A utilização de métodos cromatográficos, torna a purificação das enzimas mais eficiente. Os principais mecanismos de separação, no processo cromatográfico, dependerá de alguns fatores como a: absorção, troca iônica, afinidade específica, permeação em gel ou interações hidrofílicas. O princípio da cromatografia consiste em adicionar uma solução tampão para equilibrar a coluna, sendo adicionada em seguida a solução enzimática. A eluição da enzima se dará com o auxílio de uma solução tampão com um gradiente ou ligante específico para a enzima desejada. O eluente que sai da coluna é coletado em frações e testado quanto a atividade enzimática (WHITAKER, 1996).

A cromatografia de troca iônica, é um dos métodos cromatográficos utilizados para purificação de enzimas, baseado na ligação competitiva dos íons da proteína ou íons de sais de mesma carga, a um meio cromatográfico de carga oposta, o trocador iônico (COLLINS, 1995). Na Figura 02 encontra-se esquematizado o princípio da cromatografia de troca iônica.

A interação entre as proteínas e o trocador iônico depende de vários fatores, dentre eles: carga líquida, distribuição de carga na superfície da proteína, comprimento iônico e a natureza dos íons do solvente, pH (ou atividade de prótons). Quanto mais carregada estiver a proteína, mais forte será a ligação com o trocador iônico. Condições como pH que alteram a carga efetiva na proteína ou no trocador iônico, afetam a interação e podem ser usadas para influenciar o processo de troca iônica. O pH é um dos parâmetros mais importantes que determinam as ligações com as proteínas, bem como determinam a carga efetiva da proteína e trocador iônico. O controle do pH pela adição de sal tampão é essencial para obtenção de resultados reprodutíveis (COLLINS, 1995).

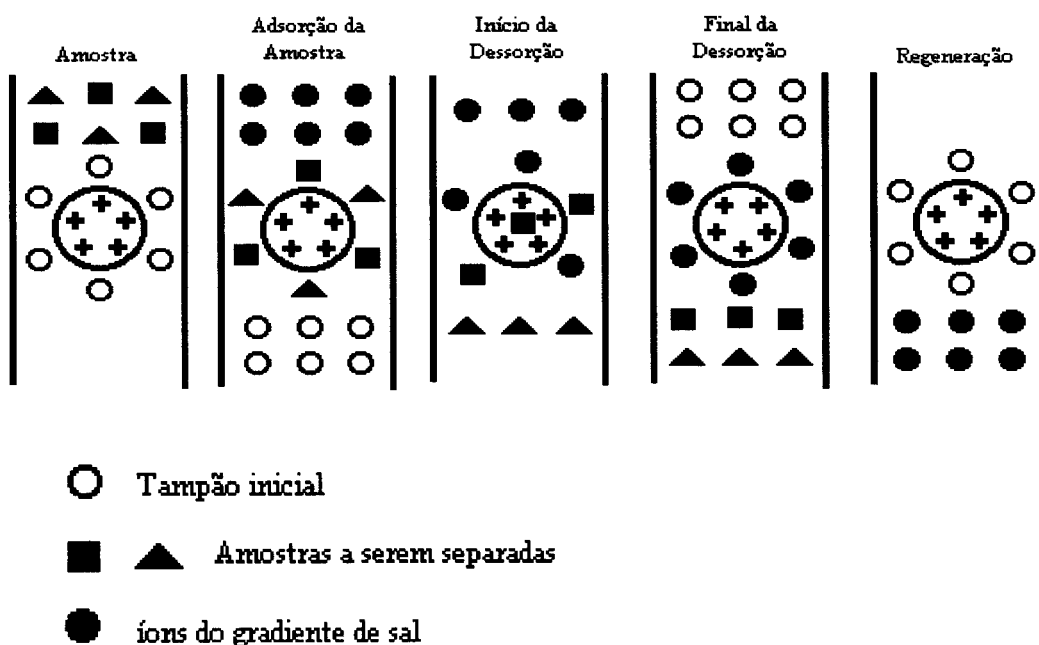


Figura 02: Esquema do mecanismo de troca iônica (SATO, 1997).

Em altas concentrações de íons de sais competitivos, as proteínas iniciarão o deslocamento do trocador iônico na ordem da força de ligação. As ligações menos fortes serão deslocadas e eluídas da coluna em primeiro lugar.

Na escolha do trocador iônico para a purificação da proteína com ponto isoelétrico conhecido, deve-se considerar a estabilidade dos componentes, sendo que:

1. se os componentes da amostra são mais estáveis abaixo do ponto isoelétrico, deve-se usar um trocador catiônico,
2. se as proteínas são mais estáveis acima do ponto isoelétrico, usa-se um trocador aniônico.

2.3.2. Produção de Frutooligossacarídeos

A produtividade dos frutooligossacarídeos a partir da sacarose, um substrato de baixo custo, com o uso de enzimas livre ou imobilizada, ainda é um fator crítico para a produção industrial. A produção pode ser realizada através de dois processos em batelada, utilizando uma enzima solúvel, ou processo contínuo com células imobilizadas (JUNG *et al.*, 1987).

O processo em batelada é considerado pouco viável devido a baixa produtividade dos produtos desejados. No entanto no processo contínuo existe uma baixa operacionalidade, resultante de uma restrição difusional na matriz do gel e também devido às perdas durante a preparação e descarte após inativação (YUN *et al.*, 1990). Desta maneira uma das formas de tentar superar estes problemas, é com o uso de técnicas de imobilização. Alguns métodos de imobilização já estão sendo estudados, tais como: suportes de vidro poroso, DEAE-celulose, alginato e trocadores iônicos de alta porosidade (HIDAKA *et al.*, 1988; YUN *et al.*, 1990 e 1992a; HAYASHI *et al.*, 1991a,b, 1992a, 1993; YUN *et al.*, 1995).

Outro fator que interfere na baixa produtividade do processo industrial dos frutooligossacarídeos a partir da enzima β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ou de *Aureobasidium pullulans* é a formação de glicose, sub-produto da síntese, a qual inibe a reação enzimática deixando cerca de 10% da sacarose não convertida. Sendo a produção máxima de frutooligossacarídeos obtida foi em torno de 55-60%, em base seca (HIDAKA *et al.*, 1988; YUN *et al.*, 1990; HAYASHI *et al.*, 1991c).

JUNG *et al.* (1989) estudando a produção do frutooligossacarídeos a partir do substrato sacarose como doador e receptor, propuseram um modelo de síntese em que a reação ocorre de maneira desproporcional. Observou-se a formação de 1-kestose e glicose a partir de 2 moles de sacarose (Figura 03). Verificou-se também que a concentração de sacarose interfere no tipo de ação

da enzima ou seja em altas concentrações, a ação de transfrutossilação é mais atuante do que a ação hidrolítica, enquanto que em baixas concentrações a ação de hidrólise é mais intensa.

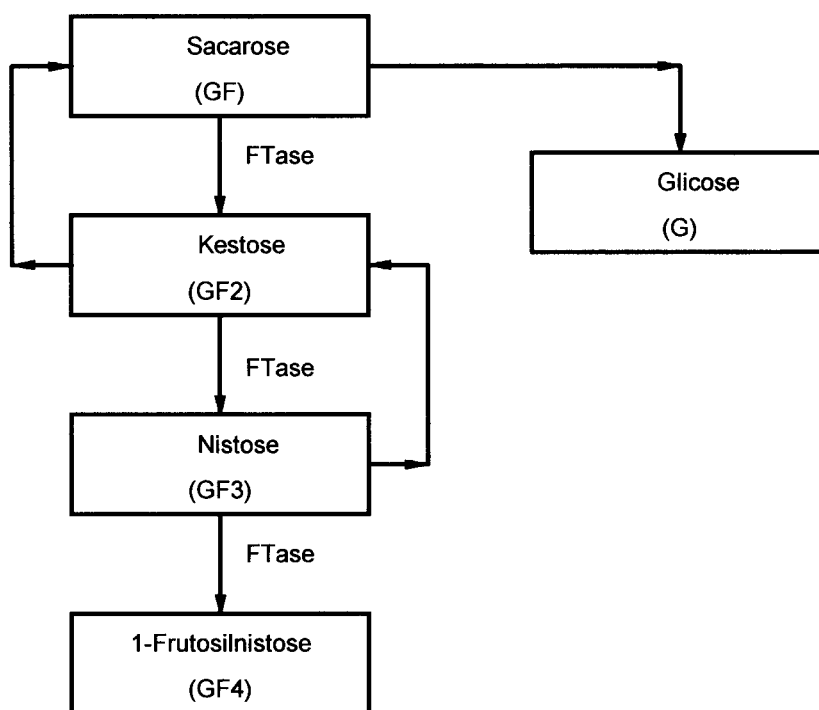


Figura 03: Esquema de produção dos fructooligossacarídeos (JUNG *et al.*, 1993).

Um processo de produção de fructooligossacarídeos com alta produtividade foi descrito utilizando-se sacarose em altas concentrações e uma enzima com uma maior ação de transfrutossilação. O processo industrial foi desenvolvido a partir de uma solução de 50 a 60% de sacarose, que passa por uma coluna com células de *Aspergillus niger*, onde ocorre a transfrutossilação, seguida por uma troca iônica para descoloração e dessalinização. O produto final corresponde a uma mistura de fructooligossacarídeos de cadeia curta, constituído por kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-frutosilnistose (GF₄) (SCHIWECK, 1995).

A reação de transfrutosilação, responsável pela produção de frutooligossacarídeos é quantitativamente diferente entre as diferentes linhagens microbianas sendo que o aumento da concentração do substrato favorece este tipo de reação. Durante a reação, observa-se uma competição entre a água e outros substratos pela transferência de radicais frutossil nas reações catalisadas pelas enzimas β -frutofuranosidases (HIDAKA *et al.*, 1988; HIRAYAMA *et al.*, 1989).

2.3.3. Aplicação Industrial dos Frutooligossacarídeos

O crescente estudo na produção de frutooligossacarídeos de origem microbiana tem se intensificado devido aos seus efeitos fisiológicos específicos em humanos. O principal deles é o estímulo ao crescimento benéfico das bifidobactérias no trato intestinal, alívio da constipação intestinal e redução no colesterol do soro sanguíneo. Todos estes efeitos, resultam numa melhoria do estado geral do indivíduo (HIDAKA *et al.*, 1986).

O efeito causado pela absorção de frutooligossacarídeos foi observado através da realização de vários testes de tolerância a açúcares, constatando-se que os frutooligossacarídeos, ao contrário da glicose e frutose, não são absorvidos. Outros testes também foram realizados sobre a absorção destes açúcares, nos quais verificou-se que as α -amilases e enzimas digestivas da mucosa intestinal, juntamente com a ingestão prolongada dos frutooligossacarídeos favorecia a ação e produção das enzimas hidrolíticas no intestino e em outros órgãos (OKU *et al.*, 1984; TOKUNAKA *et al.*, 1986; HIDAKA & HIRAYAMA, 1991).

Analisando-se da absorção de kestose e nistose no intestino humano, verificou-se que a nistose foi menos digerida do que a kestose. Levando-se a concluir que o teor de frutose é um fator determinante na digestão destes

açúcares. De uma maneira geral, com o aumento do número de moléculas de oligossacarídeos, menos digeríveis estes açúcares se tornam (OKU *et al.*, 1984; TOKUNAKA *et al.*, 1986; HIDAKA & HIRAYAMA, 1991).

A ingestão máxima diária recomendada de oligossacarídeos de acordo pelo FDA (Food and Drug Administration) é de 0,8g/dia (130 libras de peso corpóreo). No entanto, Spiegel *et al.* (1984) e Modler (1994), constataram que apesar dos alimentos naturais conterem frutooligossacarídeos, para atingirem este nível é bastante difícil. Portanto torna-se necessário a suplementação de frutooligossacarídeos na dieta para idosos e pessoas que ocupam cargos estressantes e que desejam manter o sistema digestivo saudável.

A adição destes fatores bifidogênicos na dieta humana, favoreceu num aumento da ocorrência e número de bifidobactérias, sugerindo que a suplementação de frutooligossacarídeos na dieta deveria ser implementada. Contudo, estudos mais aprofundados a respeito da eficácia destes compostos ainda são necessários. Segundo MODLER (1994), o ideal seria que nas dietas possuíssem fatores bifidogênicos para estimular o crescimento da bifidobactéria.

Com a adição de neosugar à dieta humana, em torno de 15g/dia (MODLER, 1994), verificou-se um aumento de 10 vezes na população de bifidobactérias no intestino grosso, bem como a ocorrência de bifidobactérias de 87% para 100%. Simultaneamente, observou-se uma mudança no pH intestinal de 0,3 unidades e um decréscimo na contagem de enterobacteriase.

Os frutooligossacarídeos que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas de mamíferos, são seletivamente utilizadas pelas bifidobactérias. As bifidobactérias são microrganismos anaeróbicos não formadores de esporos, gram-positivo, predominantes no trato intestinal de humanos e alguns animais. Esses microrganismos exercem efeito de inibição na proliferação ou infecção de bactérias nocivas (HIDAKA *et al.*, 1986; MURAMATSU *et al.*, 1992).

McKELLAR & MODLER (1989) relataram que algumas bifidobactérias utilizavam frutooligossacarídeos e produziam β -fructosidases intracelulares capazes de hidrolisar os sacarídeos. As β -frutofuranosidades de microrganismos são classificadas em dois tipos de enzimas, a primeira, denominada de invertase, que hidrolisa sacarose, mas não a inulina, e a segunda é uma *exo-inulinase* (β -fructosidase) que hidrolisa tanto a sacarose quanto à inulina. A proporção de atividade, para cada uma delas é variável (MURAMATSU *et al.*, 1992 e 1993).

Estudos similares realizado por HIDAKA *et al.* (1986) e HIDAKA & HIRAYAMA (1991), verificaram que administrando 0,8g/dia de frutooligossacarídeos durante duas semanas em pacientes senis observou-se um aumento significativo do número de bifidobactérias, em média 10 vezes após um período de 14 dias. A partir destes estudos estipulou-se que a quantidade eficaz de frutooligossacarídeos necessária para adultos é de cerca de 5g/dia. A dose efetiva diária de frutooligossacarídeos na forma bruta é de 3,0 g/dia, sendo que a dose mínima requerida para indução da diarreia é de 44g para o homem e 49g para mulher (HIDAKA *et al.* 1986; SPEIGEL *et al.*, 1994).

Os frutooligossacarídeos mesmo não possuindo os efeitos físicos da fibra, como: aumento da viscosidade, ligação com água e efeitos espessantes, apresentam efeitos similares benéficos à saúde como aqueles atribuídos às fibras (TOMOMATSU, 1994).

A contribuição dos frutooligossacarídeos à saúde está diretamente relacionada às suas características fermentativas (fator de crescimento das bifidobactérias). As fibras, especialmente as solúveis em água, parecem também contribuir para a saúde humana, através da fermentação. As vantagens que os frutooligossacarídeos apresentam sobre as fibras são: um menor requerimento diário (3,0 g/dia), não causam diarreia nas doses recomendadas, são levemente adocicados, apresentam textura e sabor razoáveis, são totalmente solúveis em água, não são viscosos, não se ligam a minerais, são estáveis e mais fáceis de serem incorporados em bebidas e alimentos processados (TOMOMATSU, 1994).

Algumas publicações relatam efeito anticancerígeno das bifidobactérias em testes com pequenos animais. De acordo TOMOMATSU (1994), este efeito anticancerígeno estaria relacionado com o aumento na imunidade causado pelos componentes da parede celular e componentes extracelulares das bifidobactérias.

2.3.4. Inulinase

As bifidobactérias possuem enzimas hidrolíticas conhecidas como inulinase (2,1- β -D-frutana-frutanahidrolase) que clivam os frutooligossacarídeos, ao contrário das enzimas digestivas de humanos e animais. Linhagens de bifidobactérias de animais metabolizam a inulina mais efetivamente do que as bifidobactérias de origem humana. As diferenças no metabolismo sugerem que a inulina é incapaz de atingir o sítio das enzimas das bifidobactérias humanas, ou então, um impedimento estérico poderia estar envolvido. Estudos realizados “*in vitro*” demonstraram que a *Bifidobacterium longum* tem dificuldade de metabolizar polímeros de cadeia longa, tais como a inulina (McKELLAR & MODLER, 1989).

As enzimas hidrolíticas são classificadas de acordo com o modo de ação, sendo as inulinases classificadas em endo-inulinases e exo-inulinases. As exo-inulinases desempenham importante papel na hidrólise da inulina, separando as moléculas de frutose a partir do terminal não redutor da cadeia de inulina, quebrando as ligações β -(2 $\rightarrow$ 1). A liberação da frutose durante a reação ocorre segundo um mecanismo em cadeia, numa ampla faixa de pH e temperatura (VANDAMME & DERYCKE, 1985).

As inulinases microbianas atuam sobre o substrato sacarose, de modo similar a invertase. Entretanto, as invertases apresentam uma fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose. A diferença entre as duas enzimas pode ser observada pela relação S/I, que corresponde a atividade relativa sobre sacarose

e inulina, que pode ser determinada da seguinte forma:

$$\frac{\text{Sacarose}}{\text{Inulina}} = \frac{\text{Unidades totais de atividade de invertase}}{\text{Unidades totais de atividade de inulinase}}$$

Para altos valores de S/I, a enzima obtida é a invertase. Entretanto para baixos valores de S/I menores que 50, indicam que a enzima em questão é inulinase (VANDAMME & DERYCKE, 1985).

2.3.4.1. Microrganismos Produtores de Inulinases

Ao contrário das inulinases isoladas de tubérculos e raízes de plantas, que não apresentam atividade em invertase, as inulinases obtidas a partir de microrganismos como bactérias e fungos apresentam uma notável atividade sobre a sacarose (SCHNEIDER, 1996).

Comparando as exo-inulinases obtidas de leveduras com as de bactérias, observou-se que as de leveduras apresentam um padrão enzimático muito restrito, uma vez que todas as enzimas que foram estudadas até o momento, obtidas a partir de leveduras são exo-frutanas com atividade tanto de inulinase quanto de levanase (FUCHS, 1985).

A seleção de microrganismos produtores de proteínas heterólogas para utilização industrial, depende da sua acessibilidade genética e de suas características fisiológicas. Dentre as leveduras produtoras de exo-inulinases, as do gênero *Kluyveromyces* apresentam melhor desempenho. O interesse do uso destes microrganismos na produção de proteínas heterólogas, se encontra no fato delas pertencerem ao grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) e são aceitas pelo FDA ("Food and Drug Administration") dos Estados Unidos para produtos farmacêuticos e alimentícios (SCHNEIDER, 1996).

2.3.4.2. Caracterização das Inulinases

2.3.4.2.1. Temperatura e pH de Estabilidade

Estudos realizados com inulinases intra e extracelular obtida de *Saccharomyces fragilis*, indicam que estas são razoavelmente estáveis a 50°C, mas sofrem desnaturação a 70°C. Entretanto a inulinase intra e extracelular de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, incubada por 8 horas a 50°C, não apresentaram nenhuma perda de atividade. Porém, quando a reação enzimática ocorre a temperaturas mais elevadas observou-se uma considerável perda de atividade da enzima. A inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 apresentou atividade ótima sobre o substrato inulina a 50°C. Utilizando-se a enzima de *Kluyveromyces fragilis* bruta, purificada ou imobilizada, a hidrólise máxima da inulina ocorreu a 55°C (SCHNEIDER, 1996).

A inulinase *Kluyveromyces marxianus* intra e extracelular, apresentou atividade ótima na faixa de 4,8-5,2. A inulinase purificada ou imobilizada de *Kluyveromyces fragilis* mostrou atividade ótima em pH 5,5 enquanto que a enzima intra e extracelular de *Saccharomyces fragilis* na faixa de pH de 5,0 a 5,5. Estes baixos valores de pH encontrados para a inulinase, tornam-se bastante atrativos para a indústria, pois diminuem os riscos de contaminação microbiana e no preparo de xaropes reduzem a formação de cor, uma característica indesejável (SCHNEIDER, 1996).

2.3.4.2.2. Parâmetros Cinéticos

A determinação precisa da constante de Michaelis-Menten, expressa em termos de molaridade, é prejudicada porque a inulina além de não apresentar um peso molecular definido durante a reação, sofre mudança do comprimento da

cadeia a qual torna-se sempre menor. Um outro fator considerado, é a solubilidade limitada e a natureza polidispersa da inulina que impede uma determinação confiável. Uma maneira de contornar este problema é a utilização de oligossacarídeos com grau de polimerização crescentes para obtenção das constantes de afinidade para inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 12424 (VANDAMME & DERYCKE, 1983).

Na determinação da constante de Michaelis, utilizou-se como substrato sacarose, rafinose e estaquiose que correspondem a um di, tri e tetrassacarídeos, respectivamente. Observou-se que um aumento no comprimento da cadeia do substrato utilizado produziu um aumento bastante considerável no valor de K_m para a invertase, enquanto que para inulinase o valor de K_m permaneceu relativamente constante (GROOTWASSINK & FLEMING, 1980).

O valores de K_m para inulinase imobilizada de *Kluyveromyces fragilis*, utilizando como substrato a inulina, encontra-se entre 0,54-0,67 mmol/l enquanto que para a inulinase bruta o valor de K_m é da ordem de 1,7 mmol/l (GUPTA *et al.*, 1994a).

3. Materiais e Métodos

3.1. Produção da Enzima

Para produção da enzima foi utilizado um processo fermentativo otimizado no Laboratório de Bioengenharia-DEA (COSTA,1986). Na Figura 04, encontra-se esquematizada as etapas de produção da enzima com alta atividade enzimática.

O meio de cultura selecionado foi o que melhor se adequou as condições do microrganismo para produção de uma enzima com alta atividade enzimática, mantendo-se as condições de fermentação controladas em termos de pH, temperatura, velocidade de agitação e vazão de ar.

No processo de síntese para produção dos frutooligossacarídeos foi utilizada a enzima purificada.

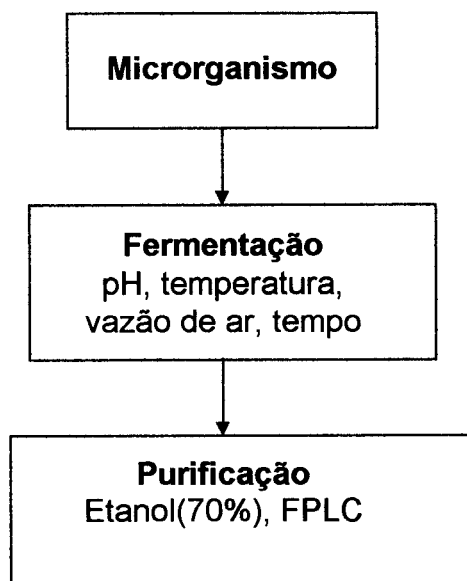


Figura 04: Fluxograma de produção da enzima

3.1.1. Microrganismos

Inicialmente foram realizados estudos com os microrganismos *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*. Sendo a levedura *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 selecionada para a produção da enzima exo-inulinase. Esta enzima foi utilizada em todos os ensaios destes trabalho.

3.1.2. Manutenção da Cultura

Os microrganismos foram repicados periodicamente em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura P.D.A. (Potato Dextrose Agar).

3.1.3. Preparo do Inóculo

A composição do meio de cultura utilizado consiste em:

Composição	Concentração (g/l)
Sacarose	20,0
Extrato de levedura	5,0
K ₂ HPO ₄	5,0
NH ₄ Cl	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65
KCl	1,15
pH	6,8

Frascos de Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml do meio de cultura para pré-fermentação, foram previamente esterilizado a 121° C por 15 minutos. Em seguida os frascos foram inoculados com uma alçada da cultura estoque. Após a inoculação, o meio foi incubado a 30° C e 200 rpm em agitador rotatório durante 24 horas (período satisfatório para crescimento do microrganismo).

3.1.4. Fermentação

A fermentação foi conduzida sob condições ótimas de produção da enzima (COSTA, 1986). No processo fermentativo foram utilizados três meios de cultura, para analisar o melhor meio de produção da enzima com alta atividade.

Meio 01	
Composição	Concentração (g/l)
Sacarose	30
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
pH	3,5

Meio 02	
Composição	Concentração (g/l)
Sacarose	30
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	3,5

Meio 03	
Composição	Concentração (g/l)
Melaço	30
AMM ¹	40
K ₂ HPO ₄	5,0
pH	3,5

1= água de maceração de milho

Nesta etapa utilizou-se um mini-fermentador de 1 litro contendo 700ml de meio de cultura previamente esterilizado, sendo em seguida inoculado com 5% do meio do item 3.1.3.

A temperatura durante a fermentação foi mantida constante a 30°C utilizando um banho termostatizado TECNAL TE-184. A taxa de aeração foi mantida entre 0,2-0,3vvm (CONTIERO,1992). As amostras foram retiradas em intervalos regulares para determinação de massa seca, açúcar redutor, pH e atividade enzimática. A fermentação transcorreu em um período de 18 horas.

3.1.4.1. Recuperação da Enzima

O caldo fermentado foi centrifugado a 5000g por 10 minutos a 5°C, visando a separação do sobrenadante para próxima etapa, sendo o precipitado descartado.

Inicialmente foi determinada a atividade enzimática do sobrenadante para o cálculo de rendimento. A precipitação da enzima foi realizada adicionando-se etanol com 70% de saturação a - 15°C ao sobrenadante, o qual foi mantido em banho de gelo sob agitação branda (WHITAKER, 1996).

Após a adição do etanol, a solução foi centrifugada a 5000g por 15 minutos a 5°C, utilizando-se centrífuga refrigerada SORVALL® RC PLUS 26. O precipitado contendo a enzima foi ressuspendido em tampão fosfato 0,05M, pH 5,2. A atividade enzimática foi determinada para o cálculo do rendimento, que consiste em:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{\text{atividade do caldo enzimático}}{\text{atividade enzimática do precipitado}}$$

3.2. Síntese dos Oligossacarídeos

No estudo da síntese de oligossacarídeos foi utilizado um micro-reator encamisado (6,5x3,5cm). No reator foram adicionados 2,0 ml da solução enzimática purificada em 16,0 de solução a 50% (w/v) de sacarose. Todas as sínteses foram realizadas num tempo de 60 horas, com variações na temperatura e pH.

3.2.1. Estudo do efeito do pH, Temperatura e Tempo na Síntese dos Oligossacarídeos

Com o objetivo de obter oligossacarídeos, a síntese foi realizada inicialmente a diferentes valores de pH, para determinar a melhor faixa de produção. Procurou-se trabalhar na faixa de pH da estabilidade da enzima, entre os valores de pH 3,0 a 8,0, temperatura numa faixa de 30 a 50°C e tempo de síntese de 60 horas.

A reação foi conduzida em mini-reatores encamisados, adicionou-se 8,0 ml de sacarose com uma concentração de 500g/l e 2,0ml de solução enzimática em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 5,2. As amostras foram retiradas em tempos pré-determinados. Nesta etapa a temperatura foi constante mantida com banho termostatzado modelo TECNAL TE-184.

3.2.2. Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram retiradas em vários intervalos de tempo durante um período de 60 horas. A identificação e quantificação dos produtos foi realizada usando um sistema de cromatografia líquida (HPLC), coluna de troca iônica SHODEX SC 1011, fase móvel água. Os padrões de açúcares kestose, nistose e 1-frutossilnistose foram adquiridos junto à companhia japonesa Wako Pure Chemical Industries Ltda., e os padrões sacarose, glicose e frutose da Merck.

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Massa Seca

Para determinação da massa celular construiu-se uma curva padrão de densidade ótica em função da massa seca.

$$\text{M.S. (g/l)} = 1,025 \times \text{ABS} \quad (\text{M.S.} = \text{massa seca})$$

Na determinação da quantidade de massa seca na amostra, foram retiradas amostras de 10 ml do caldo fermentado. As amostras foram centrifugadas a 5000g x 10 minutos em centrífuga refrigerada, marca SORVALL®RC 26 PLUS, a temperatura de 5°C. A massa celular foi ressuspensa em 10 ml de água destilada e absorbância determinada a 600 nm. A atividade enzimática e açúcares redutores foram determinados no sobrenadante do meio de cultura.

3.3.2. Açúcares Redutores Totais

Nas análises de açúcar redutor, foi utilizado o método de DNS (MILLER, 1959). O reagente DNS é composto de 1416 ml de água destilada, 10,6g de 3,5 ácido dinitrosalicílico, 19,8g de NaOH. Dissolveu-se tudo a quente e adicionou-se em seguida 7,6 ml de fenol (fundido a 50°C).

Neste método misturou-se 1,0 ml da amostra convenientemente diluída de maneira tal que a concentração da amostra esteja no máximo a 1,0 g/l, com 1,0 ml de DNS. A mistura foi mantida em banho-maria a 100°C por 5 minutos e resfriada logo em seguida em banho de gelo. Na mistura adicionou-se 16,0ml de tartarato duplo de sódio e potássio, que age como estabilizante da cor. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Micronal B342II a 540nm. Utilizou-se a sacarose como açúcar padrão.

3.3.3. Curva Padrão de Açúcar Redutor Total

Tubos de ensaios com 1,0 ml de solução de sacarose em concentrações diferentes na faixa de 0,1-1,0g/l (sensibilidade do método). Em seguida fez-se a hidrólise da sacarose adicionando 1,0 ml de HCl 1N, deixando 5 minutos em banho-maria. A amostra foi colocada em banho de gelo e adicionou-se 1,0 ml de NaOH 1N e 1,0ml do reagente DNS por 5 minutos em banho-maria, seguido de banho de gelo. Adicionou-se 16,0ml de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura foi realizada a 540nm. Para calibração do aparelho substituiu-se a amostra por água destilada, correspondendo desta maneira ao branco. Em seguida construiu-se o gráfico de concentração em função da absorbância.

3.3.4. Atividade Enzimática (Invertase e Inulinase)

A dosagem da atividade enzimática foi realizada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. O método consiste na utilização de um micro-reator encamisado sob agitação e controle de temperatura com auxílio de um banho termostatzado TECNAL TE-184. No reator adicionou-se 5,0ml de solução de sacarose a 0,06M, 2,5ml de tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 5,2, 1,5ml de água destilada e 1,0ml da amostra convenientemente diluída. O mesmo procedimento foi efetuado substituindo a solução de sacarose por inulina (fluka), para determinar atividade de inulinase. A reação para sacarose ocorre na temperatura de 40°C, e para inulina a 50°C.

Foram retiradas 1,0ml da amostra nos intervalos de tempo 1', 3', 5', 7' e 9' e analisou-se os açúcares redutores totais. Construiu-se a curva de absorbância em função do tempo e com auxílio da curva de calibração de açúcar redutor foram determinadas as atividades enzimáticas. Uma unidade por ml de solução enzimática (UI/ml) é definida como sendo a capacidade da enzima hidrolisar 1μmol/ml de sacarose por minuto.

3.3.5. Dosagem de Proteínas

Na dosagem de proteínas foi utilizado o método de Lowry (COSTA, 1986). No preparo dos reagentes para dosagem de proteínas foi utilizada a seguinte metodologia:

reagente A: 2% de Na_2CO_3 em uma solução 0,1N de NaOH.

reagente B: 0,5% CuSO_4 em uma solução de 1% de tartarato duplo de sódio e potássio.

reagente C: 50,0 ml do reagente A + 1 ml do reagente B.

O reagente de Folin Ciocalteau foi misturado com água destilada na proporção 1:1. Na dosagem misturou-se 1,0 ml da amostra com 5,0 ml do reagente C, sendo a mesma homogenizada e mantida em repouso por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,5 ml de Folin Ciocalteau diluído 1/2. Deixou-se novamente em repouso por 30 minutos e fez-se a leitura no espectrofotômetro a 750 nm. Para calibração do espectrofotômetro substituiu-se a amostra por 1,0 ml de água destilada. Com o auxílio de uma curva padrão de albumina bovina quantificou-se a proteína da amostra.

3.3.6. Cromatografia Líquida - HPLC

3.3.6.1. Sistema HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

- Injetor automático Varian 9095
- Bomba ternária Varian 9010
- Forno Spark Holland 99
- Detector de índice de refração R14
- Software para aquisição e processamento de dados e geração de relatórios - Millennium Chromatography Manager- Waters
- Pré-coluna e coluna Shodex Sugar SC1011 (8x 300mm)

A pré-coluna e a coluna foram conectadas em série seguindo as condições padrão de uso.

3.3.6.2. Preparo da Fase Móvel

O critério básico para análise dos açúcares em HPLC é a solubilidade da fase móvel. A fase móvel utilizada foi água ultra pura obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus. A fase móvel foi degaseificada em banho ultrassom Eurosonic modelo SX- à vácuo durante 1 hora, diariamente. O fluxo do eluente, a água, foi aumentado lentamente até atingir 0,3ml/min. O sistema foi deixado com a fase móvel até conseguir estabilização do índice de refração (RI) monitorado pela linha de base do software Millenium.

3.3.6.3. Curva de Calibração

Para construção da curva de calibração foram preparadas inicialmente soluções padrões de kestose, nistose, 1-frutossilnistose, glicose, frutose e sacarose; todas nas concentrações de 0,5% a 3,0%, resultando ao todo sete soluções padrões. Em seguida, todas as soluções anteriormente citadas de uma mesma concentração, foram misturadas de modo a formar uma solução padrão de uma determinada concentração, a qual foi submetida a análise cromatográfica. De forma semelhante outras soluções padrões foram preparadas, por meio de mistura até se obter as sete soluções padrões.

Utilizando o software Millenium de aquisição de dados, foi feita a integração e otimização dos picos para cada padrão com base no melhor coeficiente de regressão. A curva de calibração obtida para cada padrão foi utilizada na identificação e quantificação das amostras.

3.3.6.4. Preparo das Amostras

Foram retiradas amostras de 1,0ml em intervalos de tempos pré-determinados durante um período de 60 horas. Foi adicionada 1,0ml de uma solução de etanol 1,0% (etanol PA 95%), para separar a proteína remanescente da síntese. Em seguida centrifugou-se a 5000g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro MilliPore 0,45 μ m. As amostras foram diluídas convenientemente, para ficar numa faixa de concentração de 0,5-3,0%.

3.3.6.5. Injeção das Amostras no Sistema HPLC

As amostras foram injetadas em uma coluna Shodex Sugar SC 1011 nas seguintes condições de operação.

- Temperatura ambiente: 22-24°C
- Temperatura do forno : 80°C
- Temperatura do detector de índice de refração (RI): 45°C
- Volume de injeção : 98 μ l
- Fluxo do eluente: 0,3ml/min

3.3.6.6. Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram identificadas, integradas e quantificadas utilizando um software Millennium de aquisição e processamento de dados, tendo como base a curva padrão do item 3.2.6.3.

3.3.7. Cromatografia Líquida - FPLC

3.3.7.1. Sistema FPLC- (Fast Protein Liquid Chromatography)

O sistema de FPLC consta dos seguintes equipamentos:

- Mixer (para gradiente de eluição)
- Controlador de Cromatografia Líquida LCC-501 Plus
- Duas bombas P-500 para injeção dos eluentes
- Uma bomba P-1 para injeção
- Um monitor UV para medição do perfil de cromatografia
- Coletor de Frações FRAC-100
- Rack cromatográfico para montagem do equipamentos
- Coluna cromatográfica de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow
- Loop de 150ml para injeção de amostras

A coluna foi utilizada nas seguintes condições padrões;

- Pressão 0,3MPa
- Temperatura da sala : 22-24°C
- Fluxo 1,0ml

A manutenção da coluna é feita com etanol a 20%.

3.3.7.2. Fase móvel

Para fase móvel foi utilizado um gradiente de tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 7,5 com NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 7,5. As duas soluções foram preparadas em água Milli-Q, filtrada em filtro MilliPore

0,22 μ m. Após a filtração as soluções foram degaseificadas, durante 1 hora em banho ultrasom Eurosonic modelo SX-20 à vácuo.

3.3.7.3. Preparo e Injeção das Amostras

Nesta etapa, utilizou-se a enzima precipitada e ressuspendida em tampão fosfato de sódio a pH 5,2. A solução enzimática foi filtrada em filtro MilliPore 0,45 e 0,22 μ m. Antes de injetar a amostra, a coluna de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 7,5 a um fluxo de 2,0 ml/minuto no volume total de 40,0 ml para equilibrá-la, o que corresponde a duas vezes o volume da coluna. A coluna foi carregada com a amostra em um fluxo de 0,5 ml/minuto. A eluição da enzima foi realizada com tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 7,5, seguido de um gradiente linear ascendente de 0 a 90% de NaCl 1M em tampão fosfato de sódio 0,05M a pH 7,5 com um fluxo de 1,0 ml/minuto. O processo foi realizada a 280nm num monitor de UV conectado a coluna. Durante a eluição da enzima foram coletadas frações de 5,0ml no coletor de frações FRAC-100 e determinou-se a atividade enzimática.

3.3.7.4. Identificação das Amostras

Os cromatogramas foram analisados com auxílio de um software de aquisição e processamento de dados FPLCdirector.

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção do Microrganismo

Foram testadas três linhagens de microrganismos: *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* quanto a produção da enzima com atividade de transfrutoseilação. Na Tabela 03, encontram-se os valores de atividade enzimática, pH, açúcar redutor total (residual) após 22 horas de fermentação em meio 01 como descrito no item 3.1.4. Nas Figuras 05 a 07, encontram-se os cromatogramas referentes a produção de oligossacrídeos para os três microrganismos estudados.

Tabela 03: Atividade enzimática, pH e açúcar redutor total de culturas em fermentadores após 22 horas de fermentação

Microrganismos	pH	Açúcar Redutor Total (residual) (g/l)	Atividade Enzimática (UI/ml)
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> ATCC16045	3,43	1,178	5,03
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,04	1,39	3,07
<i>Kluyveromyces lactis</i>	5,87	1,69	2,45

Definindo como parâmetro a atividade enzimática e produção de oligossacarídeos para seleção do microrganismo, pôde-se verificar que a linhagem de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC16045 apresentou uma melhor atividade enzimática, 5,03 UI/ml em 22 horas de fermentação (Tabela 03). De acordo com os cromatogramas (Figuras 05 a 07), todos os três microrganismos apresentaram ação de transfrutoseilação e hidrólise. Entretanto a linhagem de

Kluyveromyces bulgaricus ATCC 16045 foi selecionada por apresentar uma maior produtividade na formação de oligossacarídeos, kestose e nistose, consequentemente uma maior ação de transfrutossilação.

Durante a reação verificou-se que os extratos enzimáticos bruto dos microrganismos *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis* possuem atividade de β -frutossiltransferase e β -frutossilhidrolase. As enzimas produzidas por estes microrganismos hidrolisaram a sacarose, formando além dos oligossacarídeos um polissacarídeo insolúvel em água nas condições de reação. As potencialidades deste processo não foram exploradas neste trabalho, porém merecem atenção especial em trabalhos futuros

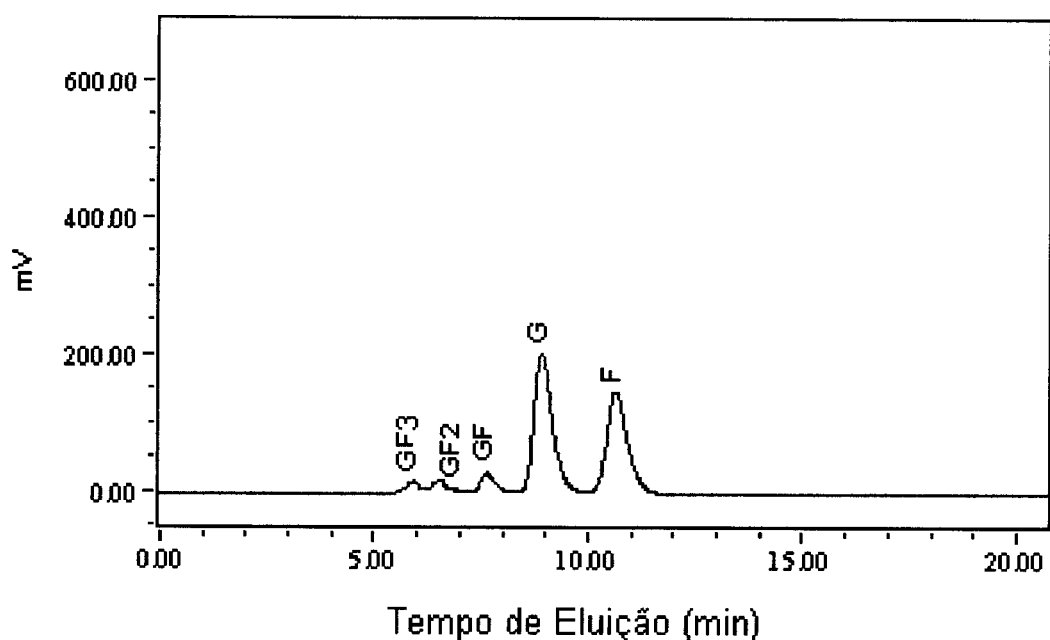


Figura 05: Produção de oligossacarídeos por *Kluyveromyces lactis* a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 21 horas.

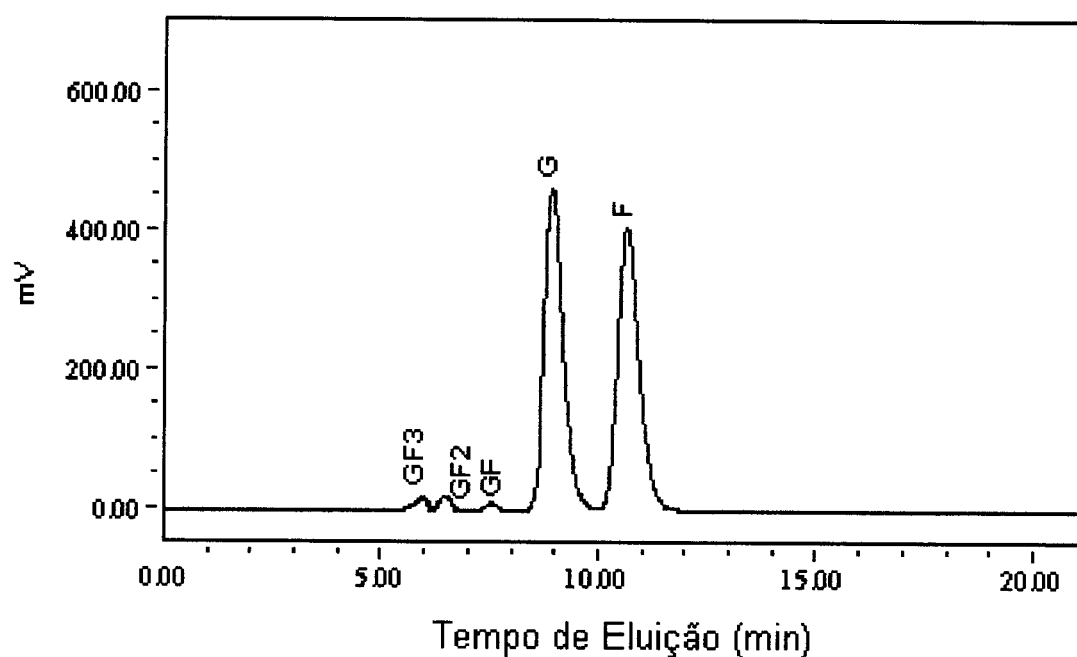


Figura 06: Produção de oligossacarídeos por *Kluyveromyces fragilis* a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 24 horas.

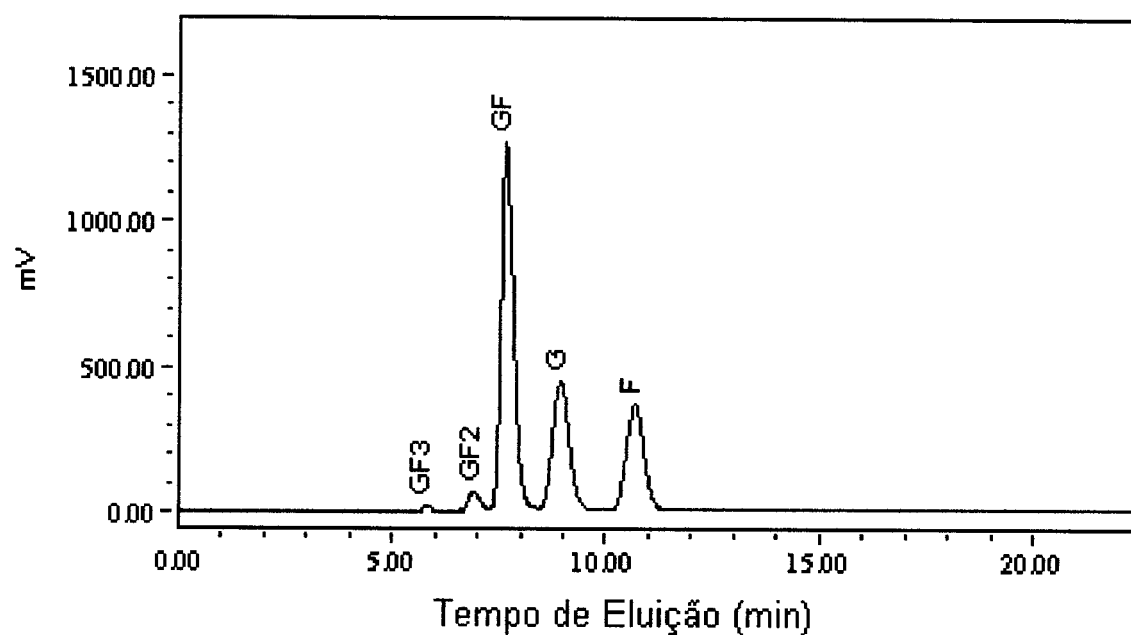


Figura 07: Produção de oligossacarídeos por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 a 30°C, pH 3,0, tempo de síntese 24 horas.

4.2. Produção da Enzima

4.2.1. Fermentação

Nas fermentações para produção da enzima por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 foram testados três meios de culturas descritos no item 3.1.4. As condições de fermentação foram: pH 3,5, temperatura 30°C, aeração 0,2-0,3vvm, agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas. Com o objetivo de selecionar o melhor meio para produção da enzima, fez-se o acompanhamento através das análises de massa seca, açúcar redutor total, atividade enzimática e pH. A Tabela 04 mostra os valores de atividade enzimática obtido nos três meios de fermentação testados

Tabela 04: Valores de atividade enzimática referente ao três meios utilizados na fermentação.

Meio	Atividade Enzimática (UI/ml)
1	4,45
2	7,54
3	10,21

Em termos de produtividade, o meio 03 composto de água de maceração de milho (AMM), melaço e K_2HPO_4 apresentou melhores resultados quanto a atividade enzimática, mas não obteve-se uma boa reprodutibilidade. COSTA (1986), estudando a produção de invertase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, verificou que mesmo mantendo as condições de cultivo inalteradas, o microrganismo apresentou um comportamento diferente, resultando numa baixa produtividade da enzima. Foi suposto que o fator idade da cultura mãe poderia influenciar, baseando-se nos resultados obtidos nas fermentações, onde variou-

se a idade da cultura mãe. Desta forma, concluiu-se que a instabilidade observada não estava relacionada com este fator, podendo associá-la estar relacionada com fatores intrínsecos. DWORSCHACK & WICKERHAM (citado por COSTA, 1986) observaram que culturas de células poliplóides produziram mais invertase do que cultura de células diplóides de uma mesma linhagem.

Para continuidade dos trabalhos escolheu o meio 02, que apresentou uma boa reprodutibilidade, apesar de ter uma atividade enzimática inferior ao meio 03. Na Tabela 05 e Figura 08, encontram-se os resultados obtidos de massa seca (MS), atividade enzimática (AE), açúcar redutor total (ART) e pH para o meio 02.

Tabela 05: Fermentação em batelada simples à temperatura de 30°C e pH a 3,5, aeração 0,2-0,3 vvm

tempo (h)	pH	MS	AE (UI/ml)	ART (g/l)
1	3,53	0,17	0,28	25,12
5	3,47	0,63	0,34	18,52
6	3,41	1,29	0,50	12,00
7	3,33	2,05	1,16	1,95
8	3,31	2,31	2,19	0,70
11	3,38	2,41	5,74	0,16
14	3,37	2,67	6,87	0,15
17	3,41	2,49	8,40	0,15
18	3,41	2,49	7,54	0,14

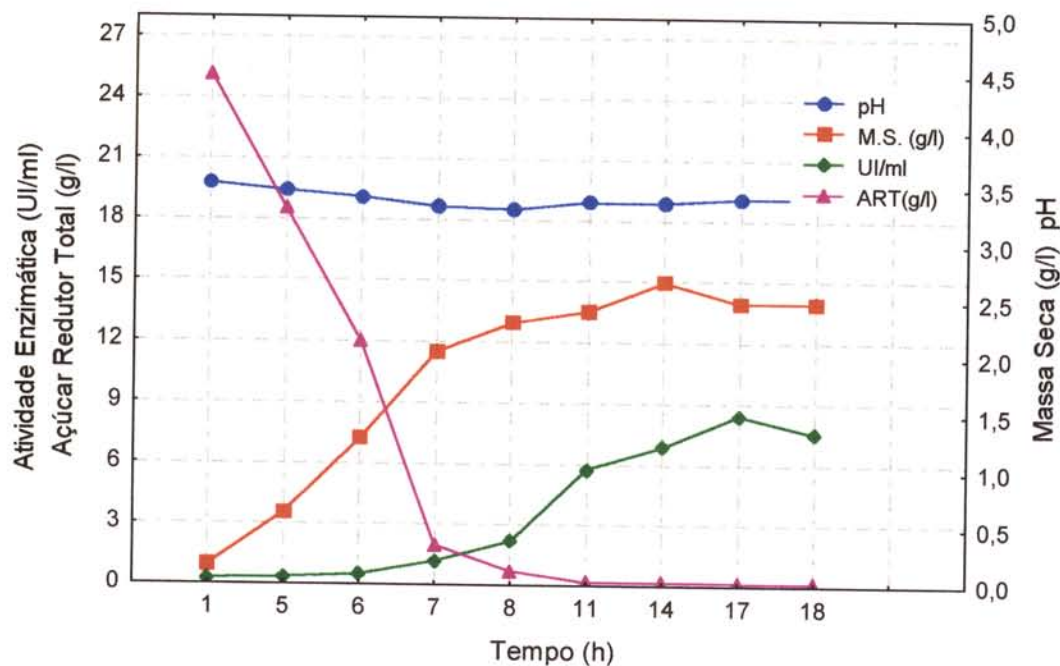


Figura 08: Fermentação em batelada simples, meio de cultura 02, pH 3,5, temperatura a 30°C e aeração 0,2-0,3 vvm.

De acordo com a Figura 08 e a Tabela 05, pode-se observar que nas primeiras 08 horas de fermentação, a produção de massa seca e o consumo de substrato atinge o seu ponto máximo. Após 17 horas de fermentação foi obtido atividade máxima de 8,40 UI/ml. Após este período de tempo, a atividade enzimática começa diminuir. Verificou-se que o tempo ótimo de fermentação para obtenção de uma enzima com boa atividade enzimática fica em torno de 17 horas. O pH durante toda a fermentação permaneceu praticamente constante.

Na continuação dos experimentos utilizou-se a enzima do meio 02 com atividade enzimática de 7,54 UI/ml.

4.2.2. Purificação da Enzima Produzida por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045

4.2.2.1. Extração da Enzima por Etanol

Nesta etapa utilizou-se um caldo isento de células com atividade de 7,54UI/ml. Um volume de 190,0 ml foi precipitado com etanol (-15°C), com grau de saturação de 70% (COSTA 1986). O etanol foi adicionado lentamente, mantendo a temperatura baixa, em torno de 4°C. As condições brandas de precipitação evita que a enzima desnature, perdendo atividade (WHITAKER, 1996).

No processo de extração obteve-se uma atividade final medida como invertase de 113,16 UI/ml e como inulinase de 13,65 UI/ml. O rendimento da extração obtido como invertase foi de 75,36% e como inulinase de 67,77%.

4.2.2.2. Purificação por Cromatografia de Troca Iônica (FPLC)

Analisando o cromatograma da Figura 09, observou-se que a enzima foi eluída numa concentração aproximadamente de 15% de NaCl (0,15M). Nesta etapa obteve-se uma atividade específica de 13,41 U/mg de proteína, fator de purificação de 9,18 e rendimento de 52,09%, em relação ao caldo bruto (Tabela 06).

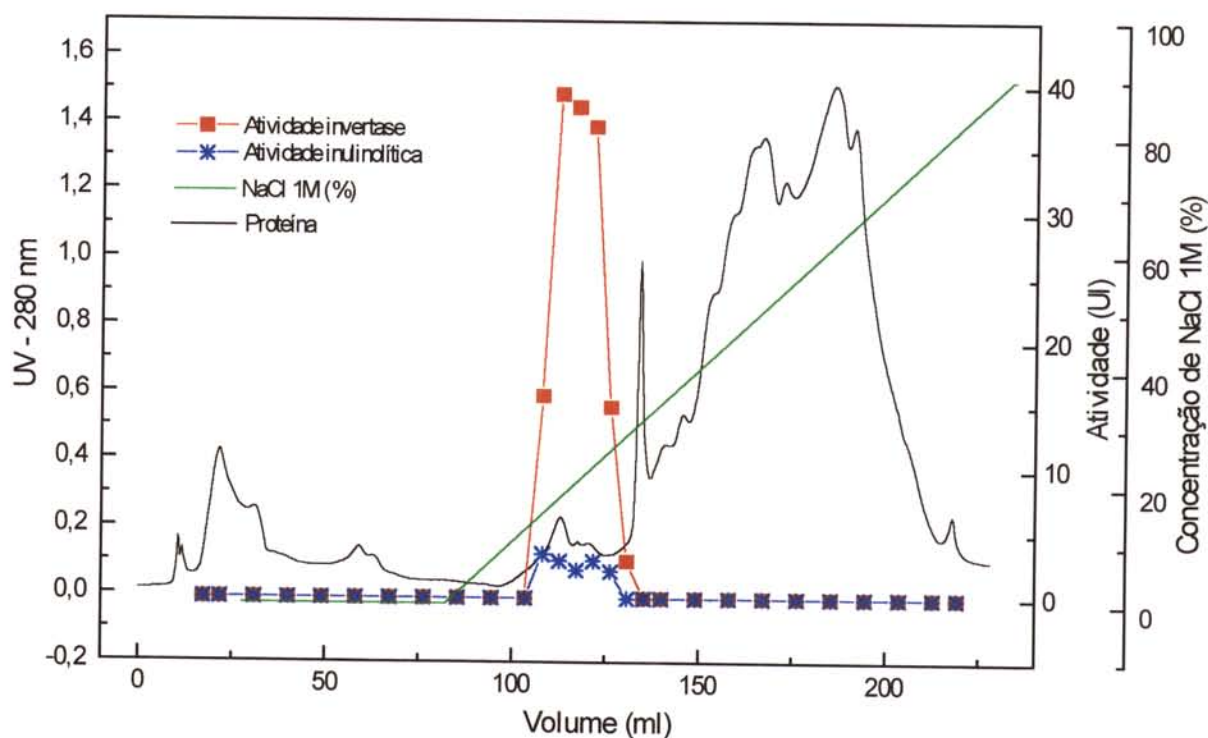


Figura 09: Cromatograma da purificação da inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 por cromatografia por troca iônica com coluna Q-Sepharose Fast Flow.

Tabela 06: Purificação da inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC16045 .

ETAPAS	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Sobrenadante	12,56	20,60	1,64	1,00	100,00
Etanol (70%)	6,60	19,95	2,11	1,45	67,77
Q-Sepharose					
Fast Flow	0,80	10,73	13,41	9,18	52,09

4.3. Caracterização da Enzima

De acordo com VANDAME & DERYCKE (1985), as inulinases microbianas por apresentarem atividade sobre a sacarose, normalmente são confundidas com invertase. A diferença entre estas enzimas pode ser observada pela especificidade do substrato, a invertase apresenta uma fraca ou nenhuma atividade sobre polímeros de frutose, enquanto que a inulinase atua sobre inulina, liberando frutose.

A relação da atividade de invertase sobre a atividade inulinolítica caracteriza a enzima. Na Tabela 07, encontram-se os valores da purificação e atividade da enzima, ou seja, no que diz respeito a atividade de invertase e atividade inulinolítica.

Tabela 07: Purificação da β -frutosidase (invertase e inulinase) de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC16045

ETAPAS	Proteína Total (mg)	INVERTASE		INULINASE		S/I ¹
		U	U/mg	U	U/mg	
Sobrenadante	12,56	150,10	11,95	20,60	1,46	7,29
Etanol (70%)	6,60	113,16	17,26	13,95	2,11	8,11
Q-Sepharose						
Fast Flow	0,80	41,47	51,83	10,73	13,41	3,86

1- unidades totais de atividade invertase/unidades totais de atividade inulinolítica

Pela Tabela 07, na etapa de purificação por cromatografia por troca iônica a atividade específica foi de 51,83 U/mg de proteína para invertase de 13,41 U/mg para atividade inulinolítica. Usando a relação de S/I, onde S corresponde a atividade de invertase e I a atividade inulinolítica, obteve-se uma razão de 3,86. De acordo com VANDAME & DERYCKE (1985), pode-se supor que a enzima em questão trata-se de uma inulinase.

4.4. Produção dos Oligossacarídeos

4.4.1.Curva de Calibração

A curva de calibração foi obtida relacionando concentrações dos açúcares e tempos de retenção. Vários tipos de ajustes foram testados para obter a melhor quantificação das amostras. Sendo que o ajuste linear foi o que apresentou os melhores resultados (Apêndice A).

A Tabela 08 mostra o tempo de retenção através da injeção das amostras nas concentrações de 0,05-3,0%

Tabela 08: Tempo de retenção (T_R) dos padrões obtidos através da injeção no sistema de cromatografia líquida (HPLC).

Padrão	Peso Molecular	Tempo de Retenção(min)
Nistose	666,58	19,583
Kestose	504,44	20,733
Sacarose	342,31	22,817
Glicose	180,16	26,650
Frutose	180,16	31,617

Equação:

Nistose(%)= 3,15 T_R - 0,16

Kestose(%)= 2,38 T_R + 0,016

Sacarose(%) = 2,92 T_R + 2,77

Glicose(%) = 3,20 T_R + 0,811

Frutose(%) = 3,09 T_R+ 0,513

4.4.2. Caracterização do Produto de Síntese

As amostras do produto de síntese foram preparadas de acordo com o procedimento do item 3.2.6.5. A caracterização foi realizada utilizando a curva de calibração do item 4.4.1. obtida pelo software "Millenium".

Inicialmente analisou-se a influência do fluxo das amostras na separação dos açúcares pela coluna. Foram testados os seguintes fluxos 0,3ml/min, 0,5ml/min, 0,6ml/min e 0,9ml/min. A vazão de 0,3ml/min foi a que apresentou melhor resolução dos cromatogramas. Sendo escolhida para as próximas injeções.

4.4.4. Reação de Hidrólise e Produção de Oligossacarídeos

4.4.4.1. Estudo Inicial do Efeito do pH

Com o objetivo de definir a melhor faixa de pH para produção de oligossacarídeos, manteve-se a temperatura constante a 40°C. A partir das análises do produto de síntese verificou-se a formação de um trissacarídeo e um tetrassacarídeo, identificado como kestose (GF₂) e nistose (GF₃) por HPLC, utilizando uma coluna Shodex SC1011. Os cromatogramas obtidos nesta análise estão apresentados no Apêndice C.

Em todos os pH estudados observou-se a produção de oligossacarídeos. A identificação e quantificação foi realizada como descrito no item 3.3.6.3, podendo ser analisadas nas Figuras 10 e 11, verificou-se que na faixa de pH de 4,0 a 6,0 ocorreu uma melhor produção dos oligossacarídeos.

Para a continuação dos estudos determinou-se as seguintes condições:

- pH: 4,0-6,0
- Temperatura: 30-50°C
- Tempo de síntese: 60 horas
- Alíquotas de 2,0ml retiradas em tempos pré-determinados
- Volume total: 18,0ml (16,0ml de solução de sacarose a 500g/l + 2,0ml de solução enzimática 28,12UI/ml)

A temperatura de síntese foi escolhida tendo como base dados da literatura para produção de oligossacarídeos.

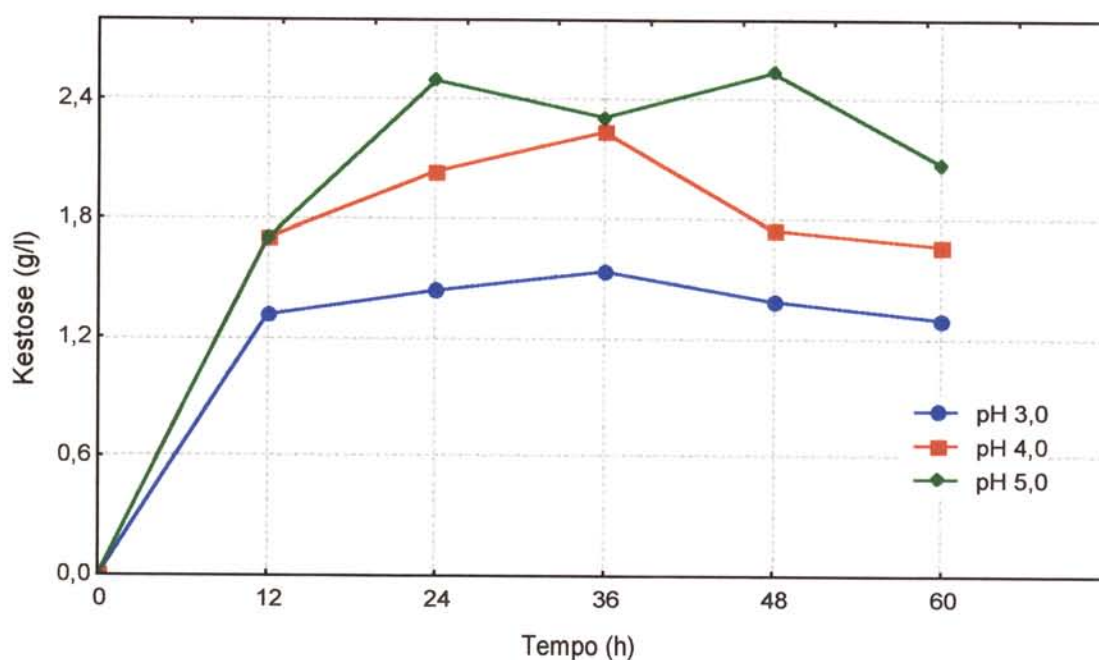


Figura 10: Produção de kestose por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, na faixa de pH 3,0-5,0 a 40°C.

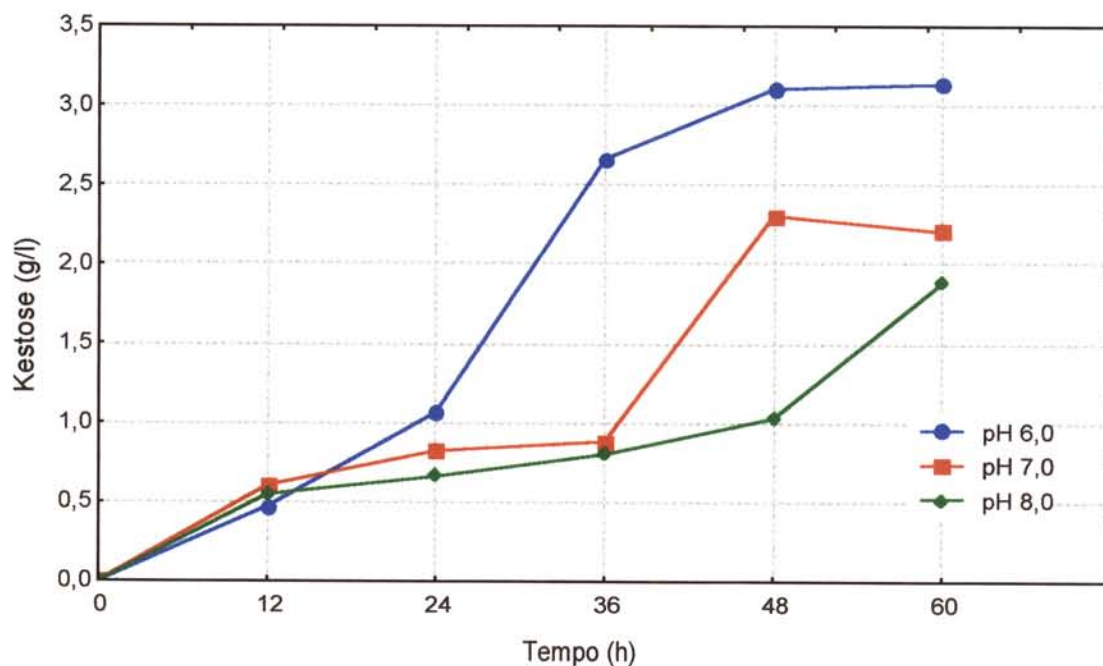


Figura 11: Produção de kestose por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, na faixa de pH 6,0-8,0 a 40°C.

4.4.4 1. Reação a 30°C

Na síntese realizada a 30°C, pH 4,0 a 6,0, observou-se a produção de dois tipos de oligossacarídeos, que de acordo com os tempos de retenção obtidos no cromatograma, foram identificados como kestose (GF₂) e nistose (GF₃), além da glicose e frutose. Os resultados destes experimentos estão representados nas Figuras 12, 13 e 14, e as respectivas tabelas estão apresentadas no Apêndice B, onde nota-se nas figuras um perfil semelhante de todos os componentes.

Nos diferentes valores de pH, a kestose aumenta inicialmente até atingir um máximo e depois declina até o final da reação, o que concorda com o modelo de reação proposto por DUAN *et al.* (1993), onde a kestose é transformada novamente em sacarose, ou ganha mais uma molécula de frutose pela reação de transfructosilação produzindo nistose. No entanto, a nistose aumenta muito lentamente, não correspondendo ao decréscimo de kestose. Esta diferença entre

a redução na concentração de kestose com um crescimento lento de nistose, pode estar relacionada com a hidrólise da kestose, liberando frutose e sacarose.

Adicionalmente, verifica-se nestas figuras que no instante em que ocorre a produção máxima de kestose (entre 10 e 20 horas de reação), ocorre mudança na tendência das curvas de sacarose, glicose e frutose, indicando existir um fenômeno que influencia na cinética global da reação. Este fenômeno merece um estudo cinético aprofundado, para se esclarecer qual tipo de influência ocorre.

Outro dado interessante é a concentração de frutose que se mantém sistematicamente abaixo da concentração de glicose, mostrando seu aproveitamento na formação de oligossacarídeos.

Com exceção do pH 6,0, a sacarose foi praticamente hidrolisada após 58 horas de reação, sendo obtido uma concentração de sacarose residual de 110,40g/l (Tabela 05-Apêndice B).

A produção máxima de kestose esteve entre 26,10 a 48,80g/l, mostrando uma atividade de β -frutotransferase relativamente baixa em relação a β -frutidase. O possível efeito inibitório provocado pela glicose deve ser o fator determinante na eficiência e rendimento da síntese de oligossacarídeos. O conhecimento destas relações podem levar a uma melhor compreensão destes resultados e um melhor aproveitamento das potencialidades da enzima. A Tabela 09 reúne os dados obtidos de maior produtividade de frutooligossacarídeos nos experimentos relacionados aos aspectos de conversão, após síntese de 20 horas.

Tabela 09: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 20 horas a 30°C.

	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES (g/l)		
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0
Sacarose	148,94	301,94	217,28
Glicose	164,78	255,48	93,42
Frutose	148,16	223,36	80,82
Kestose	26,10	48,80	30,66
Nistose	1,66	2,26	1,75
Oligossacarídeos Totais	27,76	51,06	32,41

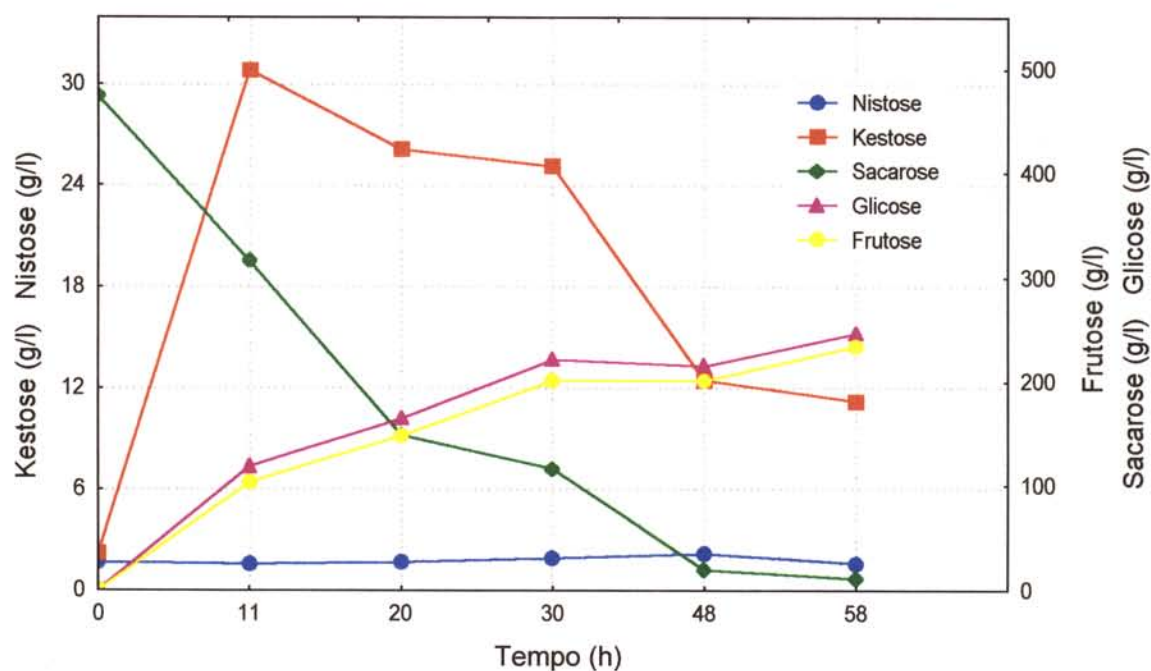


Figura 12: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 4,0 a T=30°C.

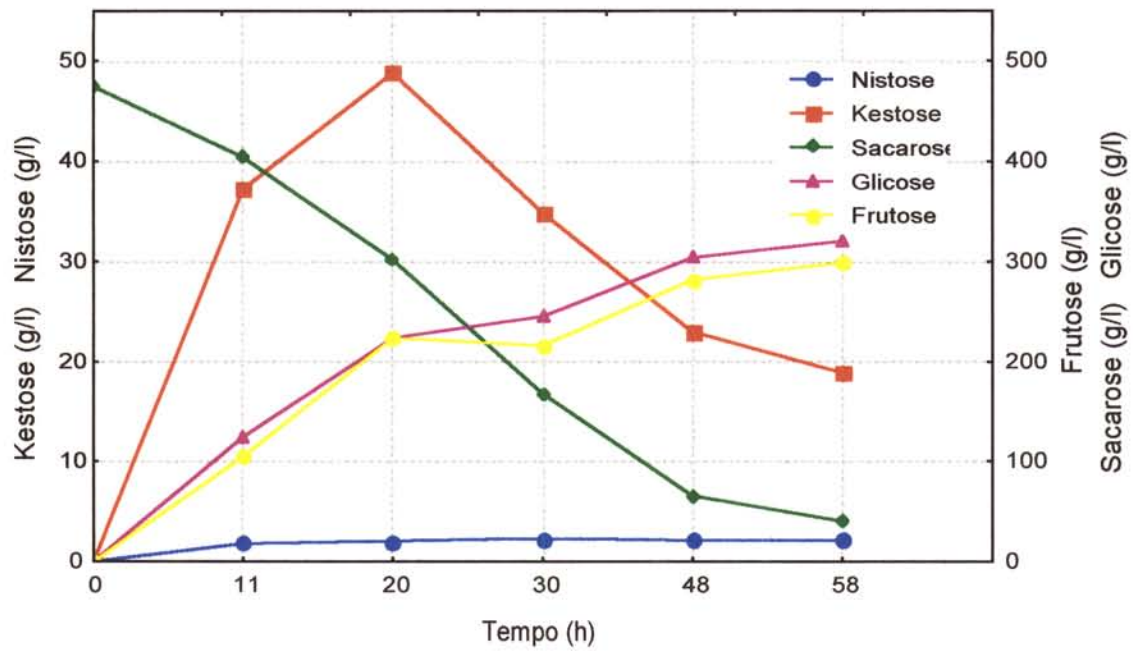


Figura 13: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 5,0 a $T=30^{\circ}\text{C}$.

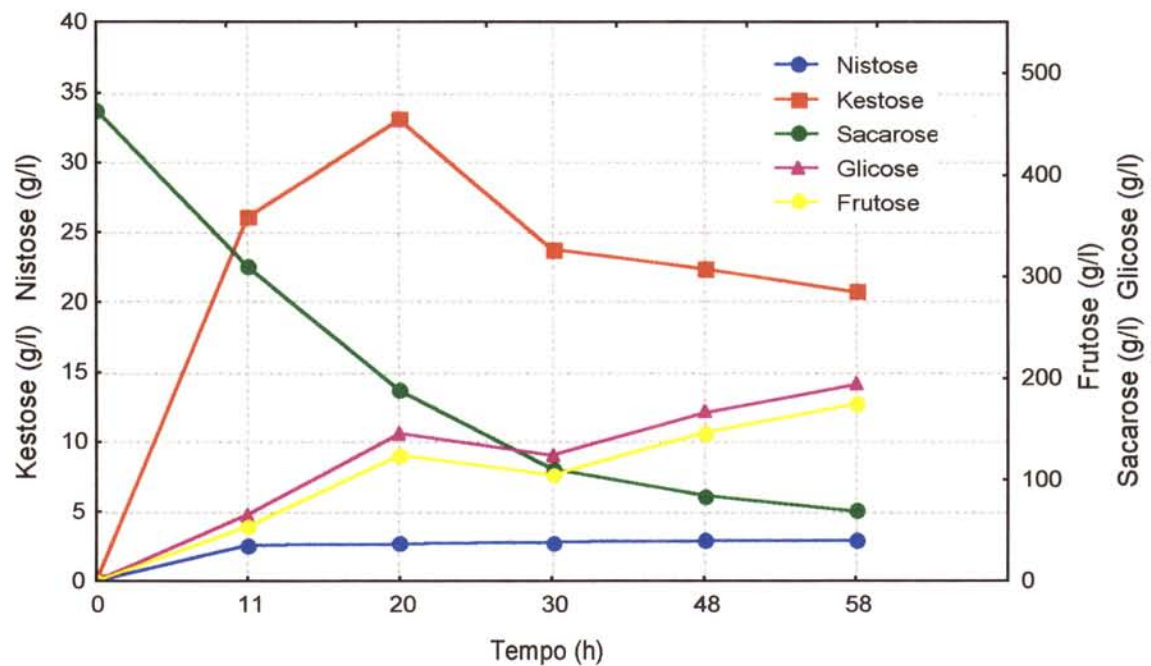


Figura 14: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC em 16045 pH 6,0 a $T=30^{\circ}\text{C}$.

4.4.4.2. Reação a 40°C

Os resultados dos experimentos conduzidos a 40°C, pH de 4,0, 5,0 e 6,0, estão apresentados nas Tabelas 06, 07 e 08 (Apêndice B) e nas Figuras 15, 16 e 17. Verificou-se que os comportamentos são diferentes dos obtidos a 30°C. Neste caso, nos pH 4,0 e 5,0 a concentração de kestose apresenta um leve declínio após passar pelo máximo, enquanto que as concentrações dos outros açúcares o comportamento é bastante similar ao observado a 30°C. A pH 6,0, a sacarose é parcialmente hidrolisada, verificando uma lenta produção de oligossacarídeos quando comparada ao pH 4,0 e 5,0. Supõe-se que ocorra uma inibição da atividade de transfructosilação pela glicose e sacarose remanescente. A concentração máxima de 29,54g/l de frutooligossacarídeos (kestose e nistose) foi obtida com 48 horas de síntese.

A conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos estão resumidos na Tabela 10, aonde pode-se observar que nenhum dos casos a conversão alcançou a 100%, havendo sempre sacarose residual após 20 horas. O máximo de kestose obtido foi entre 20,72 e 26,30g/l.

Tabela 10: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 48 horas a 40°C.

	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES (g/l)		
	pH 4,00	pH 5,00	pH 6,00
Sacarose	69,00	82,46	144,52
Glicose	193,14	165,46	69,98
Frutose	174,68	145,54	58,62
Kestose	20,72	26,30	25,00
Nistose	2,94	3,24	1,94
Oligossacarídeos	23,66	29,54	26,94
Totais			

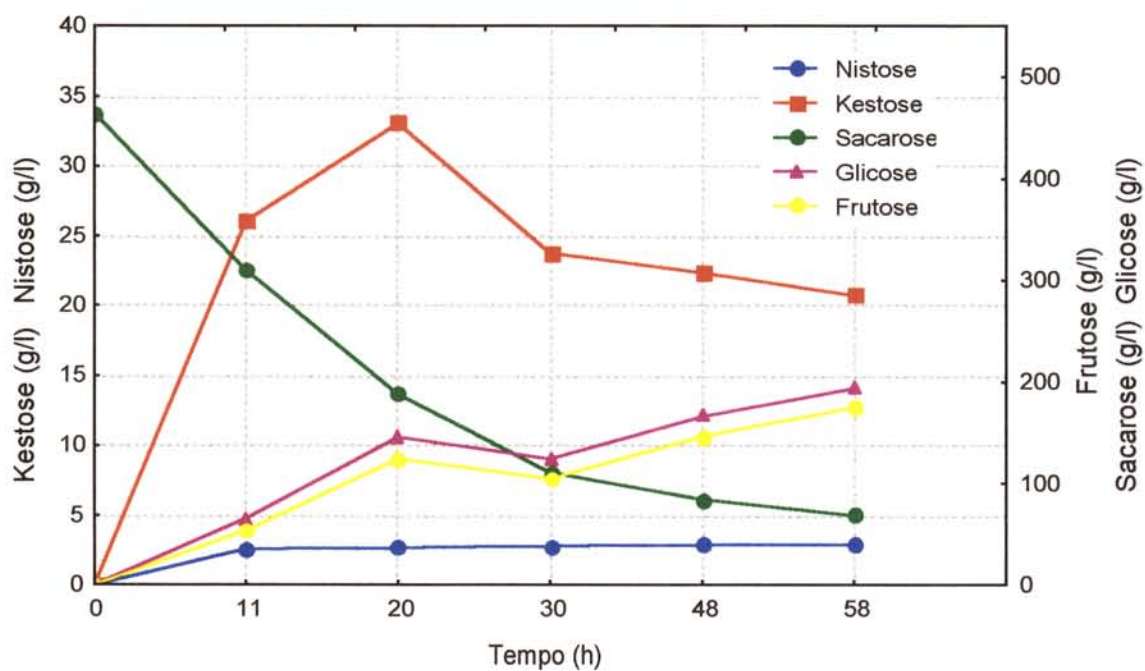


Figura 15: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 4,0 a $T=40^{\circ}\text{C}$.

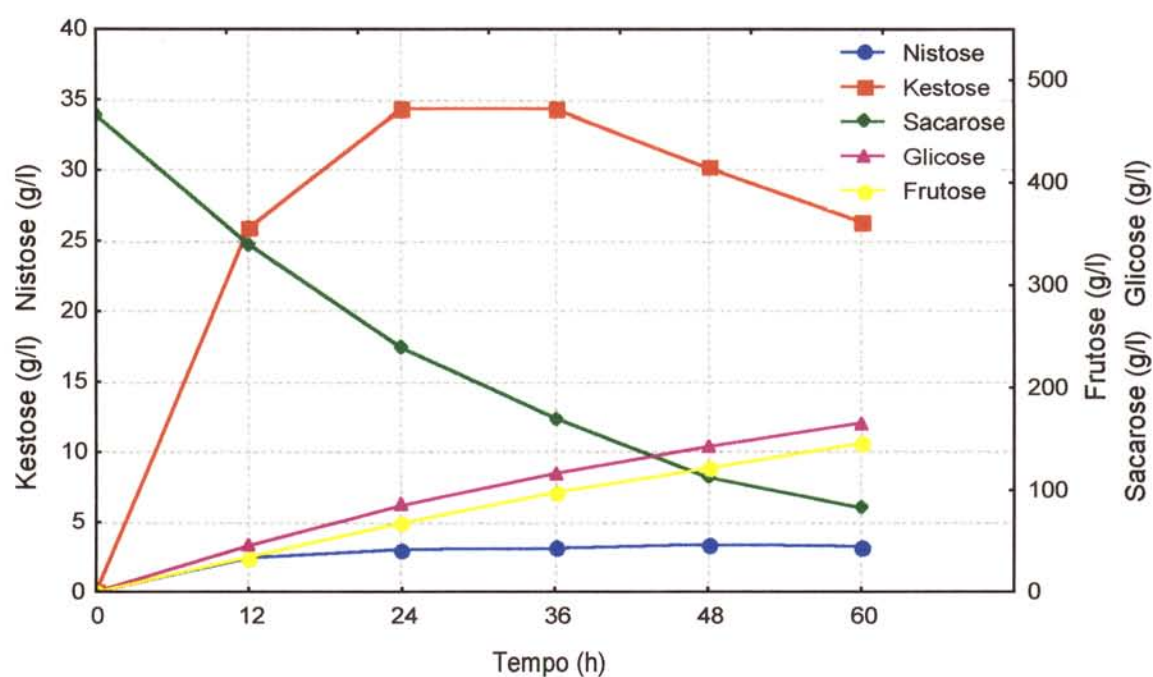


Figura 16: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 5,0 a $T=40^{\circ}\text{C}$.

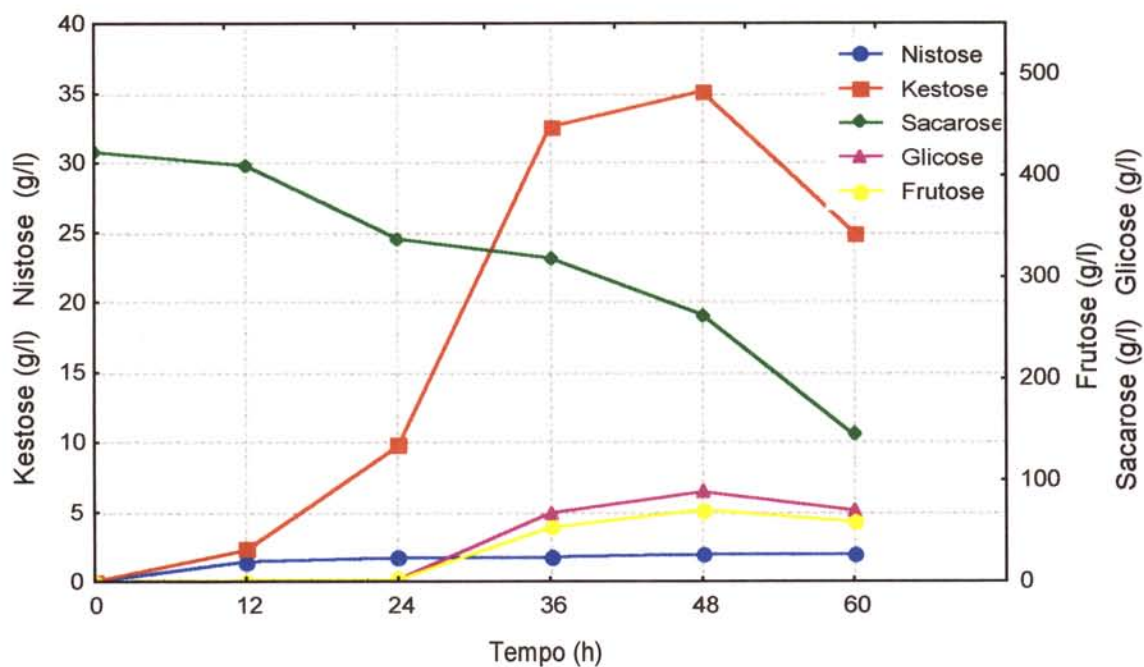


Figura 17: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 6,0 a $T=40^{\circ}\text{C}$.

4.4.4.3. Reação a 50°C

A 50°C a reação se processa mais rapidamente, sendo que a sacarose é hidrolisada praticamente em sua totalidade até 30 horas de reação. Isto pode ser verificado nas Tabelas 09, 10 e 11 no Apêndice B e nas Figuras 18, 19 e 20. Como consequência, o pico de máxima concentração de kestose também ocorre com menor tempo de reação, aproximadamente após 8 horas de processo. Não se nota diferenças significativas entre os perfis nos três diferentes valores de pH. A produtividade máxima de kestose obtida ficou entre 23,80 e 48,60g/l.

A Tabela 11 contém os dados de conversão e produção para estes experimentos.

Tabela 11: Conversão de sacarose e produção de glicose, frutose e oligossacarídeos após 10 horas a 50°C.

	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES (g/l)		
	pH 4,00	pH 5,00	pH 6,00
Sacarose	85,28	143,62	190,54
Glicose	187,94	251,92	212,68
Frutose	176,94	230,66	195,32
Kestose	23,80	41,46	48,60
Nistose	2,00	3,40	3,08
Oligossacarídeos Totais	25,80	44,86	51,68

Durante o período de síntese a concentração de oligossacarídeos produzidos, é reduzida pela hidrólise. Observa-se também a ação de transfutossilação a partir da comparação entre as concentrações de glicose e frutose. Como a concentração de frutose proveniente de hidrólise é menor do que a de glicose, conclui-se que a frutose está sendo transferida para a sacarose produzindo os oligossacarídeos. No entanto, no final do processo tem-se as concentrações de glicose e frutose praticamente iguais, indicando que quase todo o oligossacarídeo foi hidrolisado.

De acordo com DUAN *et al.* (1993) a produção de frutooligossacarídeos, oligossacarídeos com uma unidade de glicose na sua extremidade redutora, ocorre de maneira desproporcional, sendo que esta é favorecida pela atuação de transfrutossilação da enzima β -frutósíase. O aumento da concentração de nistose (GF₄), é favorecida pela atuação da kestose como aceptora de unidades de frutósil durante a síntese.

Nas três temperaturas a ação de hidrólise de sacarose foi mais acentuada do que a ação de transferência, observada pelas concentrações de kestose e

nistose formadas durante as sínteses. Segundo DUAN *et al.* (1993), JUNG *et al.* (1989), a reação de transfructosilação é fortemente inibida pela presença de glicose e de sacarose não convertida. Uma maneira de eliminar esta inibição competitiva é utilizando um sistemas de enzimas, como por exemplo glicose-oxidase, que transforma a glicose em ácido glucônico, onde a separação deste ácido dos açúcares pode ser facilmente realizada por um sistema de cromatografia de troca iônica.

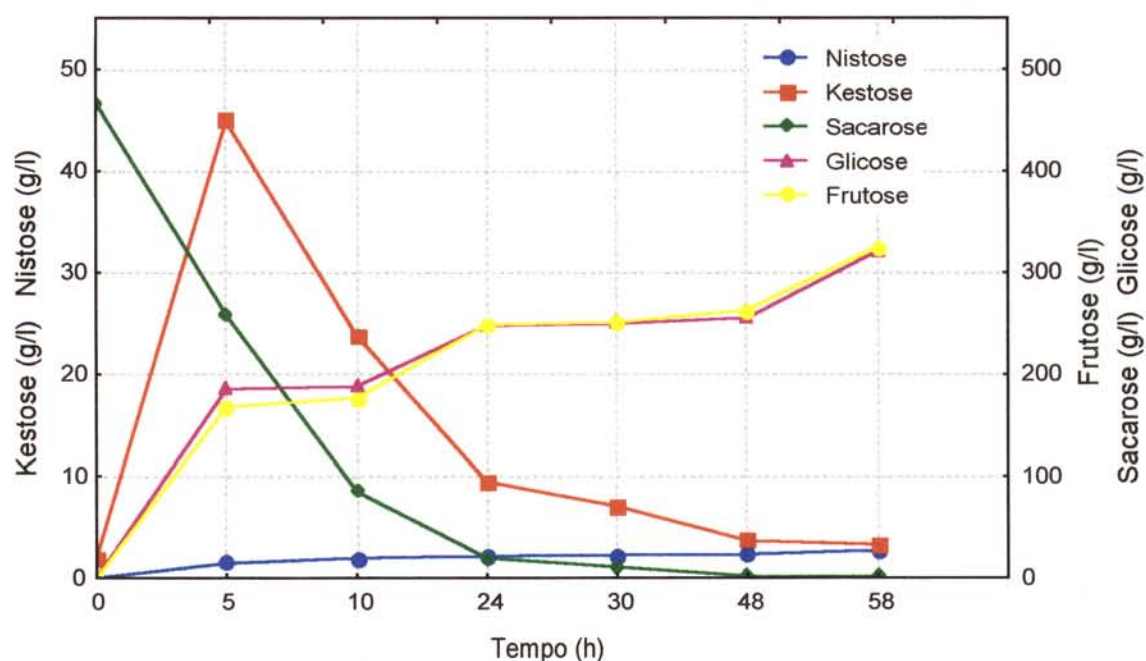


Figura 18: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 4,0 a T= 50°C.

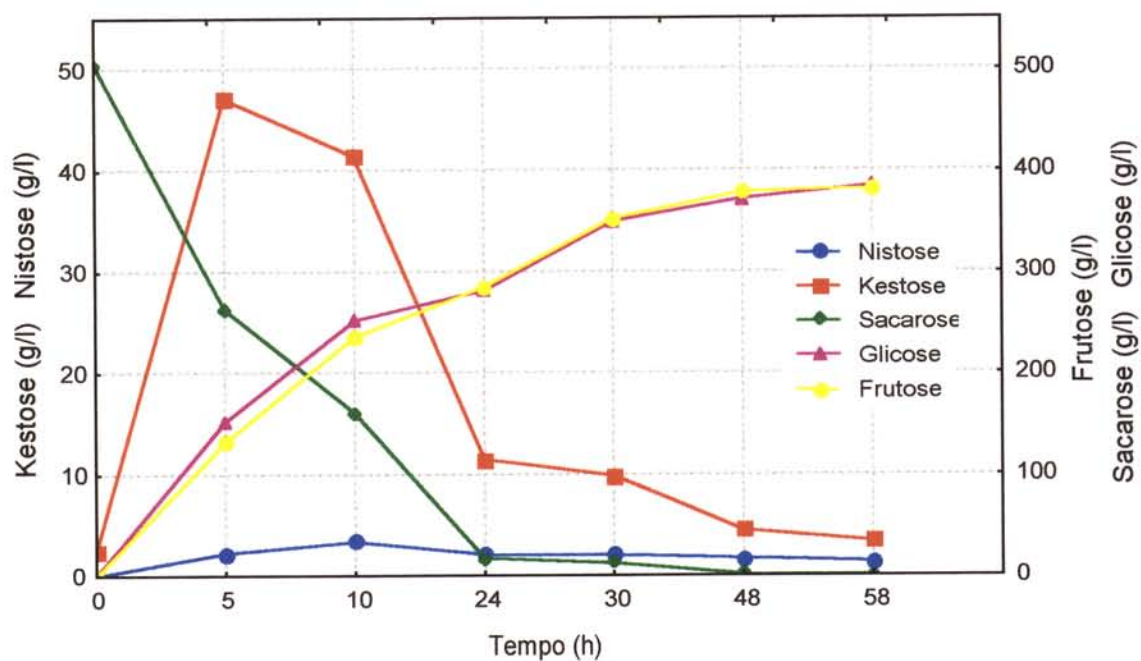


Figura 19: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 40 a T=50° C.

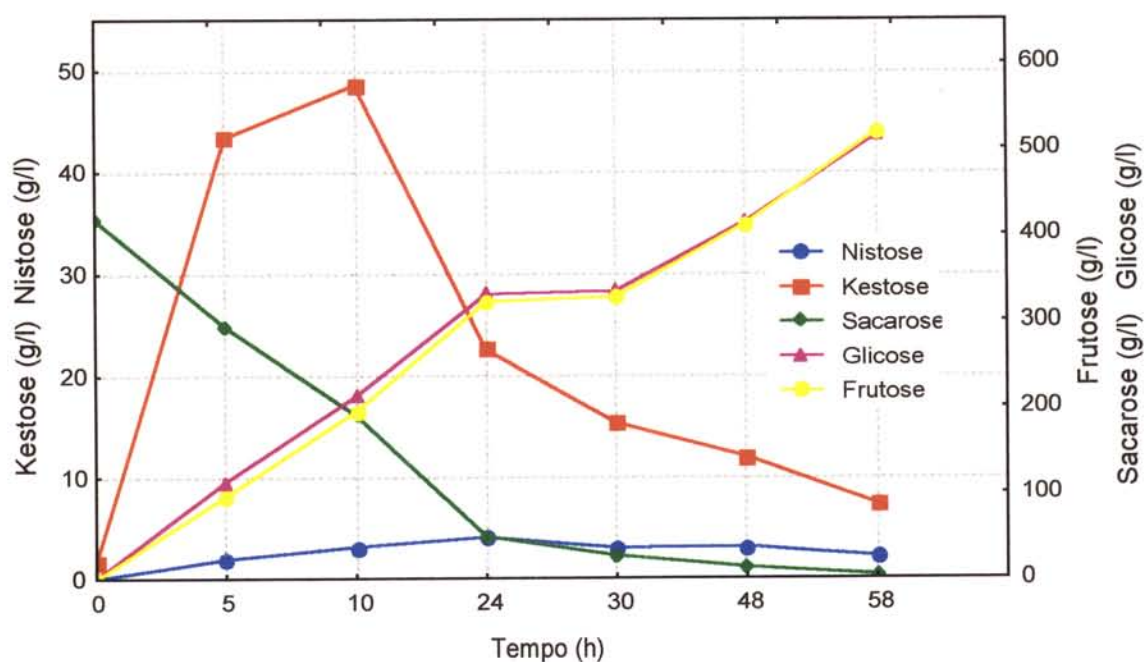


Figura 20: Síntese de oligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 em pH 6,0 a T= 50°C.

4.4.5. Produção de Oligossacarídeos (Frutooligossacarídeos)

Pelas Figuras 21-23, pode-se fazer uma melhor avaliação da produção os frutooligossacarídeos, que corresponde a uma mistura de kestose (GF_2) e nistose (GF_3), nos três pH estudado.

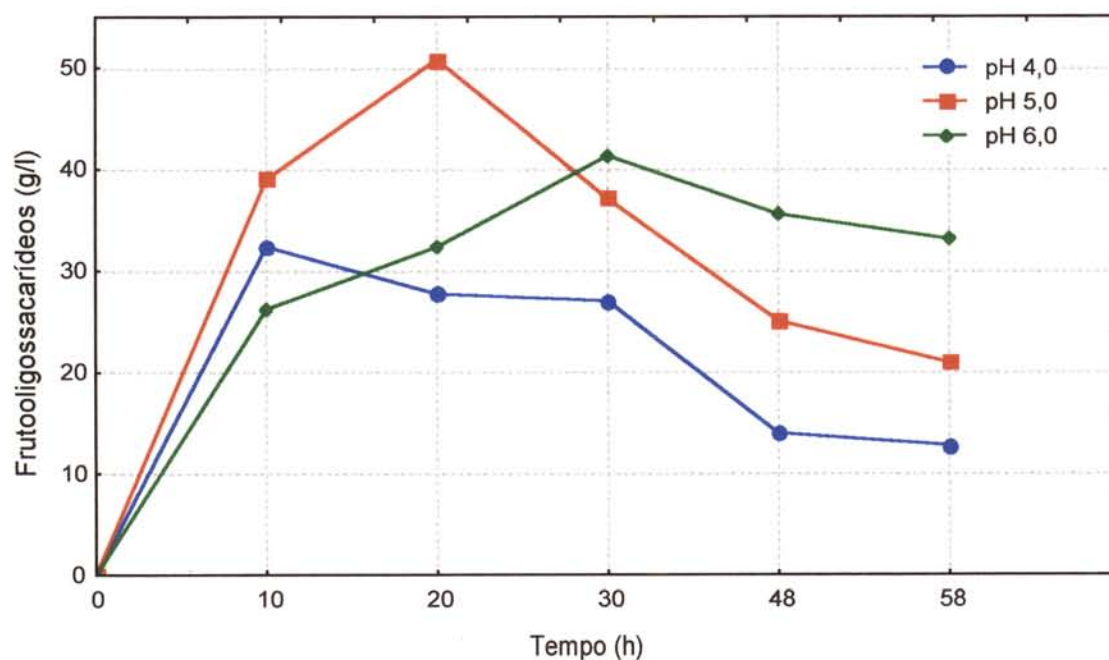


Figura 21: Produção de Frutooligossacarídeos por β -frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 a $T=30^{\circ}\text{C}$.

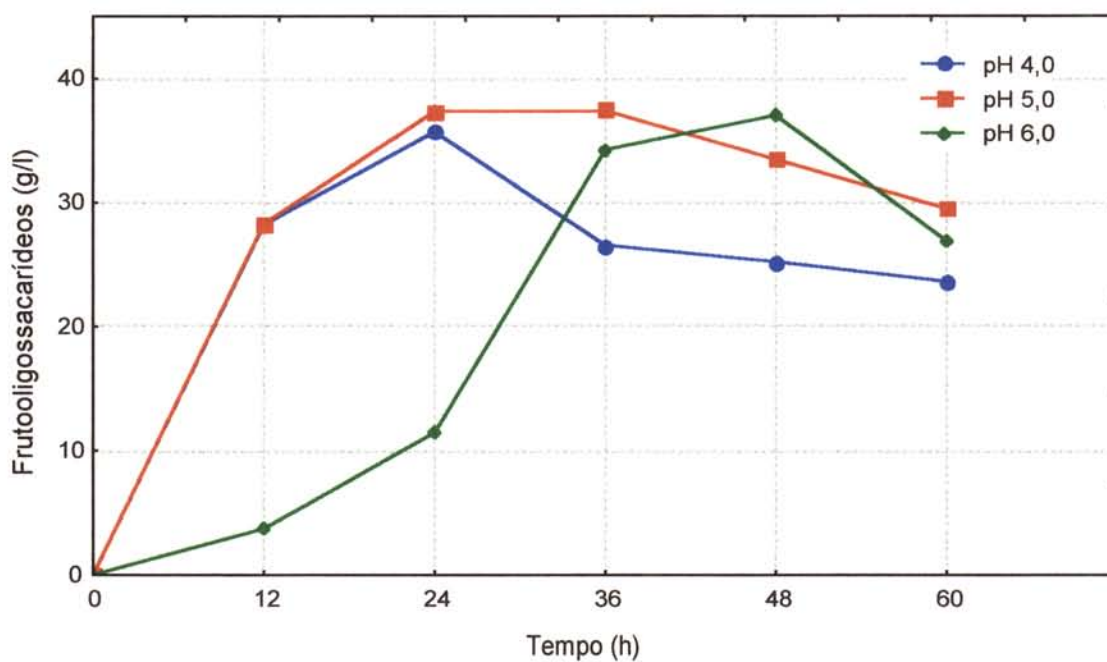


Figura 22: Produção de Frutooligossacarídeos por β-frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 a T=40°C.

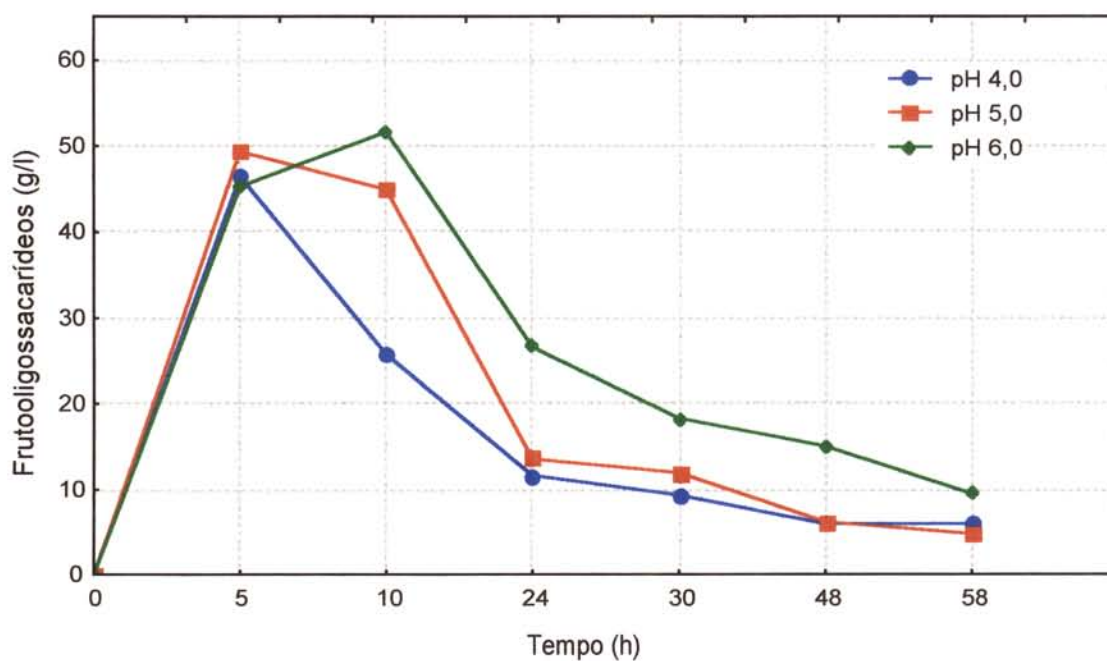


Figura 23: Produção de Frutooligossacarídeos por β-frutosidase de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 a T= 50°C.

Para a produção de oligossacarídeos, pode-se dizer que a melhor condição de reação encontrada foi na temperatura de 50°C e pH 6,0. Nestas condições ocorre a formação de 51,68 g/l de kestose mais nistose. É interessante também ressaltar que sendo esta reação inibida pela glicose, a possibilidade desta enzima atuar em combinação com outras enzimas utilizadoras de glicose, em outros valores de pH não pode ser descartado. Um exemplo é a glicose-oxidase (pH e temperatura ótima de 5,5 e 40°C) e mesmo a dextrana-sacarase (pH e temperatura ótima de 5,2 e 30°C).

As potencialidades da inulinase atuando em conjunto com outras enzimas são grandes e devem ser explorados.

5. Conclusão

Os estudos realizados com a finalidade de averiguar as potencialidades das enzimas extracelular produzidas por diferentes microrganismos, levaram as seguintes conclusões:

- As enzimas produzidas por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* hidrolisaram a sacarose e produziram oligossacarídeos. Estes oligogossacarídeos foram identificados por cromatografia líquida como sendo frutooligossacarídeos.
- As enzimas produzidas por *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces lactis*, hidrolisaram a sacarose, formando além dos oligossacarídeos também um polissacarídeo insolúvel em água nas condições de reação. As potencialidades deste processo não foram exploradas neste trabalho, porém merecem atenção especial em trabalhos futuros.
- Para produção da enzima com atividade de β -frutotransferase o microrganismo *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 foi o que apresentou melhor produtividade.
- Na purificação da enzima de *Kluyveromuyces bulgaricus* obteve-se um fator de purificação de 1,45 e atividade específica de 2,11 UI/mg após tratamento com etanol 70% e 9,18 e uma atividade específica de 13,41 UI/mg após passagem em FPLC, com recuperação de 67,77% e 52,09%, respectivamente.
- A produção de oligossacarídeos por enzima de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 obteve uma máxima produtividade a um pH 6,0, temperatura de 50°C com uma concentração de 51,68 g/l a partir de uma solução de 50% de sacarose.

- Dentre os frutooligossacarídeos produzidos, a kestose foi a de maior concentração, seguida de nistose em baixas concentrações. A produção de 1-frutossilnistose não foi significativa.
- A cinética de produção dos frutooligossacarídeos é uma cinética reversível que parece sofrer inibição, provavelmente da glicose liberada.
- A enzima inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* apresenta uma atividade β -frutossilhidrolase bastante eficiente, hidrolisando praticamente 100% da sacarose, a 500 g/l, em 58 horas.

6. Referências Bibliográficas

ALBON,N., BELL,D.J, LANCHARD,P.H., GROSS,D., RUNDELL, J. T. Kestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **Journal Chemical Society**, v.1, p.24-27,1953.

BACON,J.S.D., BELL,D.J. A new trisaccharide produced form sucrose by mould invertase. **Journal Chemical Society**, v.3, p.2528-2530,1953.

BEALING,F.J., BACON,J.S.D. The action of mould enzymes on sucrose. **Biochemical. Journal.**,v. 53, p.277-285,1953.

BURKHED,D., TAKAZOE,I. New Experimentes on palatinose (Isomaltulose) as sugar substitute, **Dtsch Zahnaertzte**, v.42, p.5124-5131,1987.

CHANG,C.T.; LIN,Y.Y.;TANG,M.S.;LIN,C.F. Purification and properties of β -fructosiltransferase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.32, p.269-277, 1994.

CLARKE,M.A, BAILEY,A.V., ROBERTS,E.J., TSANG,W.S. Polyfructose: A New Microbial Polysaccharide, **Sugar Processin Research**, Inc., New Orleans, Lousiana, USA 70124.

COLLINS,C.H.; BRAGA,G.L.; BONATO,P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos, Campinas, Editora da Unicamp, 6ª ed., 1995.

- CONTIERO, J. Estudo da Produção da Enzima Invertase Extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus*, Tese de Doutorado, FEA-UNICAMP, 1992.
- COSTA, F.A. A. Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras, Dissertação de Mestrado, FEA-UNICAMP, 1986.
- CRITTENDEN, R. ;PLAYNE, M.J.; Commercially Available Oligosaccharides, in Bulletin of the IDF 313, 10-22., 1996.
- DUAN, K.J., CHEN, J.S., SHEU, D.C. Kinetic Studies and Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose, **Enzyme Microbiological Technology**, v.16, p.334-339, April, 1994.
- DUAN, K.J.; SHEU, D.C.; CHEN, J.S. Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJI. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.57, p.1811-1815, 1993.
- EDELMAN, J.; BACON, J.S.D. Transfructosidase in extracts of the tubers of *Helianthus tuberosus* L. **The Biochemical Journal**, v.49, p.529-540, 1951.
- EDELMAN, J. Transfer reactions catalysed by some sucrose preparations. **The Biochemical Journal**, v.57, p.22-23, 1954.
- FUCHS, A. Current and Potencial Food and non-food applications of fructans. **Biochemical Society Transaction**, v19, p.555-560, 1991.

- FUJI,S., KISHIHARA,S., KOMOTO,M., SHIMIZU,J. Isolation and Characterization of Oligosaccharides Produced from Sucrose by Transglucosylation Action of *Serratia plymuthica*, **Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi**, 30(6), p.339-344, 1983.
- FUJITA,K., HARA,K., HASHIMOTO,H., KITAHATA,S. Purification and Some Properties of β -fructofuranosidase from *Arthobacter sp.K-1*. **Agricultural. Biological Chemical.**,v.54(4), p.913-919, 1990.
- FUJITA,K.,et al. Chemical Structures of Hetero-oligosaccharides Produced by *Arthobacter sp K-1* β -frutofuranosidase. **Bioscience Biotechnology. Biochemical**, v.58(2), p-239-243, 1994.
- FUJITA,K., HARA,K., HASHIMOTO,H., KITAHATA,S. Transfructosilation Catalyzed by β -fructofuranosidase from *Arthobacter sp.K-1*. **Agricultural Biological Chemical**, v.54(10), p.2655-2661, 1990.
- GHEBREGZABHER,M., RUFINI,S., SADIA,G.M., LATO,M. Improved Thin-Layer Chromatography Method for Sugar Separations. **Journal of Chromathography.**, v.180, p.1-6, 1979.
- GOLDSTEIN,H. et al. Continuous Enzymatic Production of Invertase Sugar, **Journal Fermentation Technology.**, v.55(5), p.516-524, 1977.
- GRENBY,T.H. Progress in Sweeteners, ed. GENBY,T.H., Elsevier Applied Science, London/ New York.
- GUPTA, A.K.; BHATIA,J.S. Glucofructosans Biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v.19, p.2557-2563, 1980.

- HANG,Y.D., WOODAMS,E.E., JANG,K.Y., Enzymatic Conversion of Sucrose to Kestose by Fungal Extracellular Fructosiltransferase, **Biotechnology Letteres**,17(3), p.295-298, 1995.
- HAYASHI,S.; IMADA,K. ; KUSHIMA,Y.; UENO,H. Observation of the chemical structure of fructooligosaccharide produced by an enzyme from *Aureobasidium sp* ATCC 20524. **Current Microbiology**, v.19, p.157-179, 1989.
- HAYASHI,S., NONOGUCHI,M., TAKASAKI,Y., UENO,H., IMADA,K. Purification and Properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp*. TCC 20524. **Journal Industrial Microbiology**., v.7, p.251-256, 1991.
- HAYASHI,S., MATSUZAKI,K., TAKASAKI,Y., UENO,H., IMADA,K. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.155-159, 1992b.
- HAYASHI,S., MATSUZAKI,K., INOMATA,Y., TAKASAKI,Y., IMADA,K. Properties of *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase immobilization on porous silica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.9, p.216-220, 1993.
- HAYASHI,S., MATSUZAKI,K., TAKASAKI,Y., UENO,H., IMADA,K Purification and Properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,v.8, p.276-279, 1992.
- HAYASHI,S.,et al. Continuous Production of 1-kestose β -fructofuranosidase immobilized on Shirasu Porous Glass, **Biotechnology Letters**, v.13(6), p.395-398, 1991.

- HIDAKA,H., HIRAYAMA,M., SUMI,N. A Fructooligosaccharide Producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agricultural Biological Chemical** , v.52(5), p.1181-1187, 1989.
- HIDAKA,H., HIRAYAMA,M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. **Biochemical Society Transaction**, v.19, p.561-565, 1991.
- HIRAYAMA,M., SUMI,N., HIDAKA,H. Purification and Properties of a Fructoligosaccharide from *Aspergillus niger* ATCC 20661. **Agricultural Biological Chemical**,v.53(3), p.667-673, 1989.
- HUGHES,D.B., HOOVER,D.G. BIFIDOBACTERIA:Their Potential for Use in American Dairy Products. **Food Technology**, p.74-81, April, 1991.
- YUN,J.W.;LEE,M.G.;SONG,S.K. Batch production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructofuranosidase and glucose oxidase. **Journal of Fermentation and Biotechnology**, v.77, p.159-163, 1994a.
- YUN,J.W.;KANG,S.C.;SONG,S.K. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase. **Biotechnology Techniques**, v.9, p.805-808, 1995.
- YUN,J.W.; SONG,S.K. The production high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v.15, p.573-576, 1993.

- YUN,J.W.; JUNG, K.H.; OKU?,J.W.; LEE,J.H. Semi-batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.24/25, p.299-308, 1990.
- JONG,W.Y., LEE,M.G., SONG,S.K. Batch Production of High-Content Fructo-Oligosaccharides from Sucrose by Mixed-Enzyme System of β -fructofuranosidase and Glucose-Oxidase, **Journal Fermentation Biotechnology** , v.77 (2), p.159-163, 1994.
- JUNG,H.K., YUN,J.W., KANG,K.R., LIM,J.Y., LEE,J.H. Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructooligosaccharides form Sucrose., **Enzyme Microbiological Technololgy** , v.11, p.491-494, August,1989.
- JUNG,K.H., KIM,J.H., JEON,Y.J., LEE,J.H. Production of High Fructo-oligosaccharide Syrup with two Enzyme System of Fructosiltransferase and Glucose-Oxidase. **Biotechnology Letters**, v.15(1), p.65-70, January, 1993.
- KANNO,T. New Funcional Properies of Isomaltooligosaccharides, **Gekkan Fudo Kemikaru**, v.5(10), p.61-67, 1989.
- LEE,K.J. ; CHOL,J.D. ; LIM, J.Y. Purification and properties of intracellular fructosil transferase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.411-415, 1991.
- MURAMATSU,K., ONODERA,S., KIKUCHI.M., SHIOMI,N. The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium spp.* **Bioscience Biotechnology Biochemical.**, v.56(9), p.1451-1454,1992.

- MURAMATSU,K., ONODERA,S., KIKUCHI.M., SHIOMI,N. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v.57, p.1681-1685, 1993.
- McKELLAR, R.C.; MODLER, H.W. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.31, p.537-541, 1989.
- MITSOUKA,T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health, **Journal Industrial Microbiology** , v.6, p.263-268, 1990.
- MODLER, H. W. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v.4, p.383-407, 1994.
- NABORS,L.O., INGLETT,G.E. A Review of Various Other Alternative Sweeteners. In: "Alternative Sweeteners ",ed NABORS,L.O. & GELARDI,R.C., p. 309-333, Marcel Dekker, inc, New York.
- OKU,T.; TOKUNAGA,T.; HOSOYA,N. Nondigestibility of a new sweetener "neosugar" in the rat. **The Journal of Nutrition**, v.114, p.1574-1581, 1984.
- OLIVEIRA,I.M.de A. Produção e Caracterização da β -Frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na Produção de Frutooligossacarídeos, Tese de Doutorado, FEA- UNICAMP, 1997.
- PALMER,J.K., CONRAD,E.C. Rapid Analysis of Carbohydrates by High-Pressure Liquid Chromatography, **Food Technology**, p.84-92, October,1976,.

- PARK,Y.K., ALMEIDA,M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by transfructosylase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.331-334, 1991.
- PARK,Y.K. Produção de Enzimas. In: Borzani,W., Aquarome,E.,Almeida,U.A.; Coord. Biotecnologia - Tecnologia das Fermentações, p.182-220,1975.
- PARK,R,J.W., SCHWARTZ,C.S. Modeling the Kinetics of Immobilized Glucose-Oxidase, **Bioscience Biotechnology**, v.30, p.724-735, 1987.
- PAZUR,J.H. Transfructosilation Reactions of an Enzyme of *Aspergillus oryzae* . **Journal Biological Chemical** , v.199, p.217-225, 1952.
- SIEBERT,G. Sugar Substitutes - New substances , **Dtsch. Zahnerztl Z.**, v.42, p.5128-5134, 1987.
- SCHIWECK,H., MOHAMMED,M., RAPP,K.M. New Developments in the Use Sucrose as Industrial Bulk Chemical, In: "carbohydrates as Organic Raw Materials", ed. LICHTENTHALER,F.W. , p.57-94,VCH, New York.
- SCHNEIDER, A. L. S. Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Tese de Mestrado, FEQ-UFSC, 1996.
- SHIOMI,N., ONODERA,S., CHATTERTON,N.J.,HARRISON,P.A. Separation of Fructooligosaccharides Isomers by Anion-Exchange Chromatography, **Agricultural Biological Chemical**, v.55(5), p.1427-1428, 1991.

- SPIEGEL,J.E.; ROSE,R.; KARABELL,P.; FRANKOS,V.H.; SCHMITT,D.F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredient. **Food Technology**, v.48, p.85-89, 1994.
- STRAATHOF,A.J.J.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM,H.V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, v.146, p.154-159, 1986.
- TAKEDA,H., SATO,K., KINOSHITA,S., SASAKI,H. Production of 1-kestose by *Scopulariopsis brevicaulis*. **Fermentation Biotechnology**, v.77(4), p.386-389, 1994.
- THIELECKE, K.LIEKER,H.P., PASKACH,T. Analytical Determination of Technically produced oligosaccharides by High Performance Ion Chromatography, **Zuckering**, v.114(12), p.953-961, 1989.
- TOKUNAGA,T.;OKU, J.; HOSOYA,N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharides (neosugar) on growth and gastrointestinal functions of rat. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.32, p.11-121, 1986.
- USAMI,S., TAKASHI,J., KIKIMURA,K., UEHARA,K., CHEN,J. Production of β -Fructofuranosidase Showing Fructose-Transferring Activity by *Penicillium frequentans* (*P.glabrum*), **Journal Fermentation Biotechnology**, v.72(4), p.303-305, 1991.

ZIESENITZ,S.C., SIEBERT,G., IMFIELD,T. Cariological Assesment of Leucrose as Sugar Substitute, **Caries Research**, v.23(5), p.351-357, 1989.

ZITTAN,L., POULSEN,P.B., HEMMINESEN,St.H. Enzymatic Conversion of Sucrose to Kestose by Fungal Extracellular Fructosiltransferase, **Biotechnology Letters**,.v.17(3), p.295-298, 1995.

Curva de Calibração

Millennium Results Report
 Report Method: CALIBRAÇÃO
 For Sample: PADRAO 0.5 %
 Proc Chan: SATIN
 Channel Descr: REFRACTOMETRO

December 22, 1997

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Injection: 1

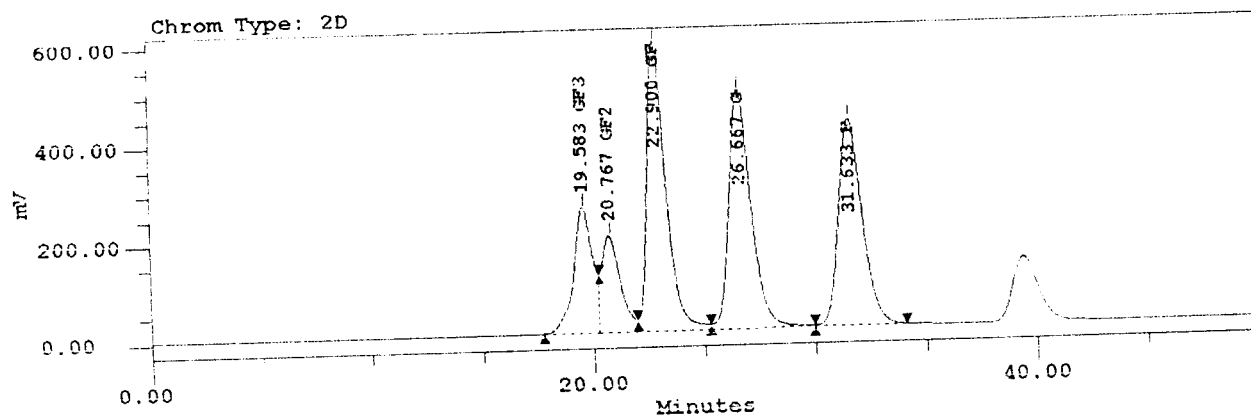
Channel: SATIN

Processed: 14/08/97 15:53:00

CURVA DE CALIBRAÇÃO - AJUSTE LINEAR

Project Name: SUGAR
 Vial: 2
 Injection: 1
 Channel: SATIN
 Date Acquired: 07/08/97 11:53:23
 Acq Meth Set: SUGAR_MS
 Processing Method: LINEAR_PM

Sample Type: Standard
 Volume: 08.00
 Run Time: 50.0 min
 Date Processed: 14/08/97 15:53:00
 Dilution: 1.00000
 Chrom Type 2D
 Percent Unknowns 0.000



GF3 Calibration Information

Processing Method	LINEAR_PM	System	11a
Channel	SATIN	Date	14-AUG-97
Type	LC	Name	GF3
Retention Time	19.583 min	Order	1
A	-457282.340823	B	6490265.138058
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.998373	R^2	0.996749
Standard Error	2173067.907560		

GF2 Calibration Information

Processing Method	LINEAR_PM	System	11a
Channel	SATIN	Date	14-AUG-97
Type	LC	Name	GF2
Retention Time	20.733 min	Order	1
A	-247106.057078	B	4974784.356103
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.997047	R^2	0.994102
Standard Error	2246486.681671		

Report Method: CALIBRAÇÃO

Version: 2.10

For Sample: PADRAO 0.5 %

Vial: 2

Injection: 1

Channel: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 14/08/97 15:53:00

Channel Descr: REFRACTOMETRO

GF Calibration Information

Processing Method	LINEAR_PM	System	11a
Channel	SATIN	Date	14 AUG 97
Type	LC	Name	GF
Retention Time	22.817 min	Order	1
A	10620339.816795	B	5295882.276275
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.990618	R ²	0.981323
Standard Error	8566644.509641		

G Calibration Information

Processing Method	LINEAR_PM	System	11a
Channel	SATIN	Date	14-AUG-97
Type	LC	Name	G
Retention Time	20.650 min	Order	1
A	5128554.905744	B	5981926.770317
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.997239	R ²	0.994486
Standard Error	5222589.770704		

F Calibration Information

Processing Method	LINEAR_PM	System	11a
Channel	SATIN	Date	14-AUG-97
Type	LC	Name	F
Retention Time	31.617 min	Order	1
A	3112113.055991	B	5970004.788393
C	0.000000	D	0.000000
E	0.000000	F	0.000000
R	0.999370	R ²	0.998740
Standard Error	2486629.393071		

Tabelas de Síntese dos Oligossacarídeos

1. Tabelas com valores das sínteses dos oligossacarídeos a diferentes pH e temperaturas

1.1 Reação a 30°C:

Tabela 03: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 30°C pH 4,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração (g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	473,66	0	0
11	1,56	30,84	315,80	118,50	103,18
20	1,66	26,10	148,94	164,78	148,16
30	1,90	25,12	115,88	221,34	201,08
48	2,16	12,50	19,64	215,16	200,94
58	1,58	11,22	9,18	246,52	234,32

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Tabela 04: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 30°C pH 5,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	474,76	0	0
11	1,78	32,20	403,40	124,66	104,76
20	2,26	48,80	301,94	255,48	223,36
30	2,260	34,84	167,90	245,48	215,98
48	2,10	22,96	65,44	303,68	281,44
58	2,02	18,90	39,90	320,26	299,02

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Tabela 05: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 30°C pH 6,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(%)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	442,14	0	0
11	1,68	24,52	324,44	48,62	42,34
20	1,75	30,66	217,28	93,42	80,82
30	1,98	39,32	236,32	168,64	143,98
48	2,16	33,94	139,52	234,44	208,56
58	2,64	30,48	110,40	258,56	231,66

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

1.2. Reação a 40°C

Tabela 06: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 40°C pH 4,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	464,48	0	0
12	2,58	26,08	309,64	65,56	53,46
24	2,90	33,06	187,66	124,24	107,88
36	2,66	23,76	110,86	145,76	124,08
48	2,82	22,34	84,76	166,02	146,06
60	2,94	20,72	69,00	193,14	174,68

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

abela 07: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 40°C pH 5,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	465,96	0	0
12	2,42	25,88	339,86	45,30	33,76
24	3,10	34,34	238,70	85,22	67,86
36	3,02	,34,32	170,84	116,46	97,36
48	3,36	30,12	112,88	142,58	121,12
60	3,24	26,30	82,46	165,46	145,54

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Tabela 08: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 40°C pH 6,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0,00	0,00	423,26	0,00	0,00
12	1,43	2,28	410,04	1,35	1,22
24	1,72	9,78	337,50	2,18	1,90
36	1,74	32,54	318,50	65,64	53,16
48	1,92	35,12	262,68	69,98	70,88
60	1,94	25,00	114,52	88,48	58,62

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

1.3 - Reação 50°C

Tabela 09: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 50°C pH 4,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	467,48	0	0
5	1,50	44,92	258,08	185,24	167,62
10	2,00	23,80	85,28	187,94	176,94
24	2,14	9,48	19,52	247,44	248,20
30	2,26	7,10	10,88	249,72	250,84
48	2,34	3,30	2,06	255,08	262,52
58	2,70	3,68	1,62	320,78	324,72

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Tabela 10: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 50°C pH 5,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	498,38	0	0
5	2,22	47,10	262,96	151,82	131,48
10	3,40	41,46	143,62	251,92	230,66
24	2,10	11,48	17,50	281,84	284,62
30	2,06	9,86	12,42	349,94	352,36
48	1,70	4,52	1,64	372,00	378,60
58	1,56	3,42	0,83	384,90	382,02

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Tabela 11: Síntese de oligossacarídeos na temperatura de 50°C pH 6,0.

Tempo de Síntese (h)	Concentração(g/l)				
	GF ₃	GF ₂	GF	G	F
0	0	0	497,68	0	0
5	1,90	43,38	293,36	113,14	96,46
10	3,08	48,60	190,54	212,68	195,32
24	4,06	22,56	48,40	33,,28	321,70
30	3,10	15,34	26,20	334,38	327,25
48	2,96	11,98	13,26	414,68	412,25
58	2,10	7,30	3,94	498,75	496,25

G= glicose F= frutose, GF = sacarose, GF₂ = kestose, GF₃ = nistose

Cromatogramas - HPLC

Report Method: AMOSTAS

Version: 2.10

File Sample: 4.0-5H-50-0.3

Vial: 25

Injection: 1

Channel: SATIN

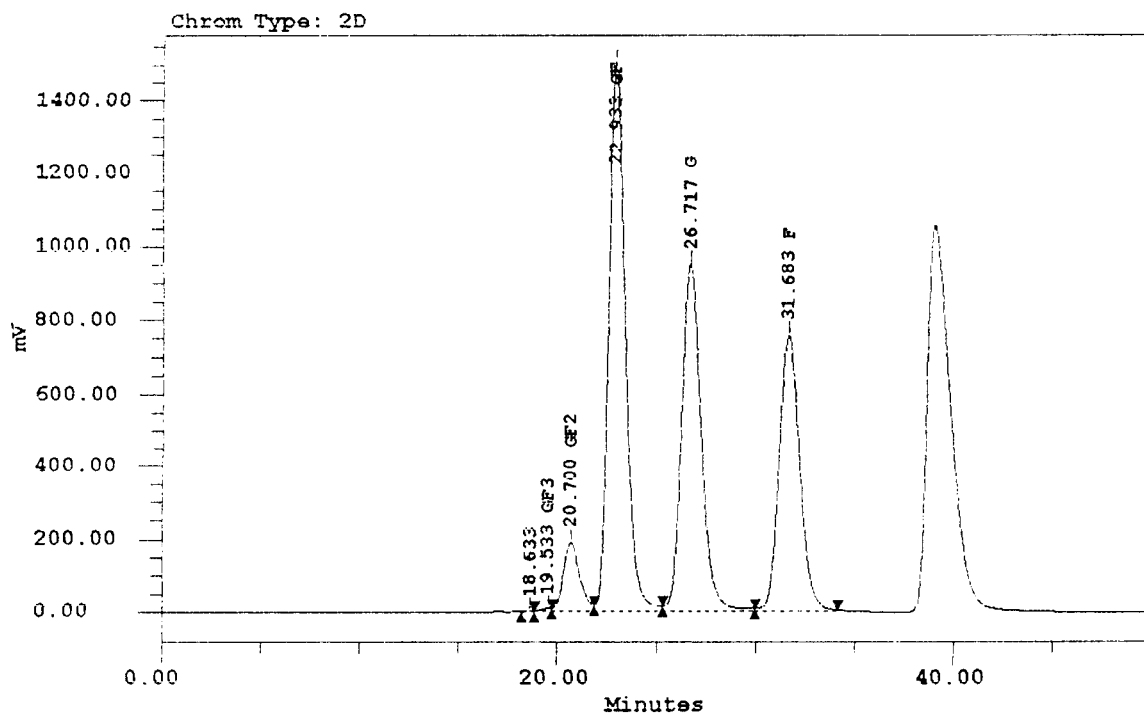
Proc Chan: SATIN

Processed: 16/08/97 11:33:36

Channel Descr: REFRACTOMETRO

Temp: 50C pH 4.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces bulgaricus

Project Name:	SUGAR	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	4.0-5H-50-0.3	Volume:	98.00
Vial:	25	Run Time:	50.0 min
Injection:	1	Date Processed:	16/08/97 11:33:36
Channel:	SATIN	Dilution:	1.000000
Date Acquired:	31/07/97 05:17:48	Chrom Type	2D
Acq Meth Set:	SUGAR_MS	Percent Unknowns	0.014
Processing Method:	LINEAR_EM		



Report Method: RMOSTAC

Version: 2.10

For Sample: 5.0-14H-40-0.2

Vial: 51

Injection: 1

Channel: SATIN

Proc Chan: SATIN

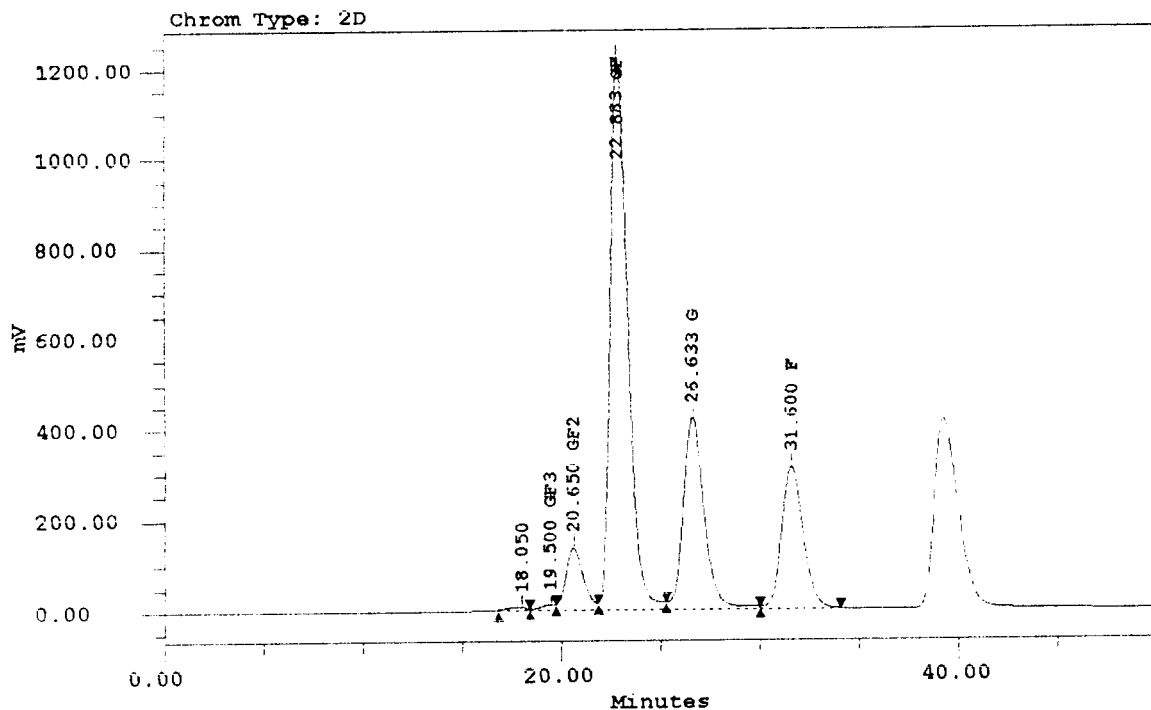
Processed: 16/08/97 13:06:17

Channel Descr: REFRACTOMETRO

Temp.400 pH 5.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces fragilis

Project Name: SUGAR
Sample Name: 5.0 24H 40 0.2
Vial: 51
Injection: 1
Channel: SATIN
Date Acquired: 01/08/97 08:49:35
Acq Meth Set: SUGAR_MS
Processing Method: LINEAR PM

Sample Type: Unknown
Volume: 98.00
Run Time: 50.0 min
Date Processed: 16/08/97 13:06:17
Dilution: 1.00000
Chrom Type: 2D
Percent Unknowns: 0.301



Report Method: AMOSTAS

Version: 2.10

For Sample: 6.0-5H-50-0.3

Vial: 39

Injection: 1

Channel: SATIN

Proc Chan: SATIN

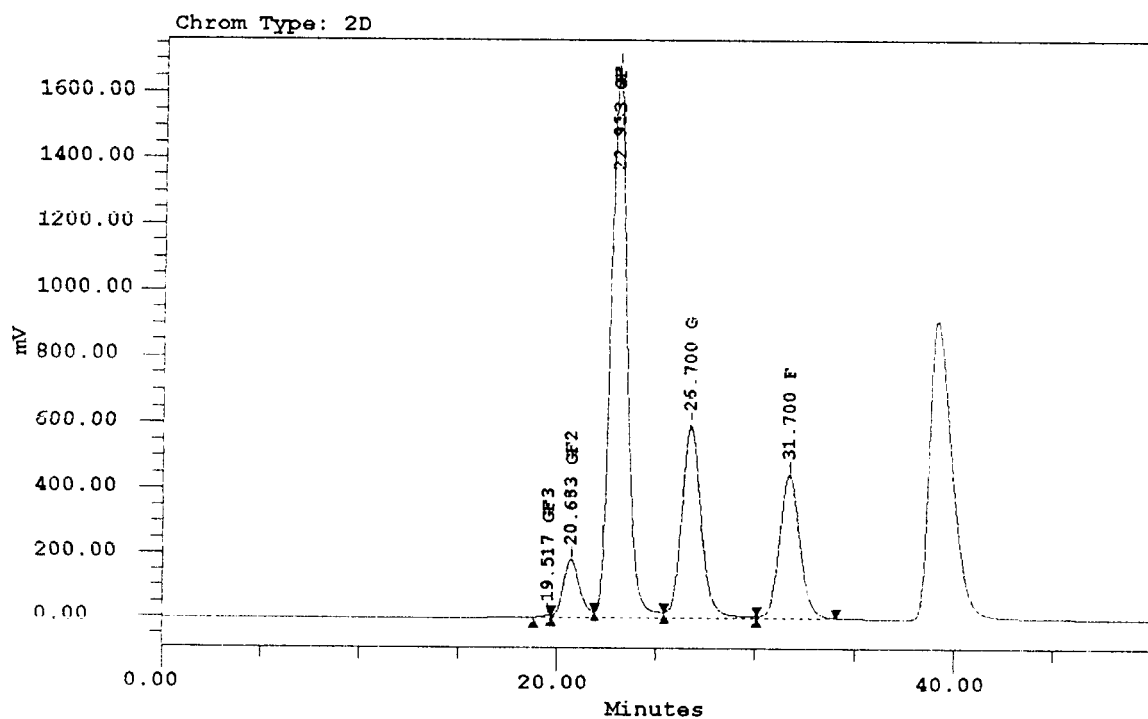
Processed: 16/08/97 11:37:22

Channel Descr: REFRACTOMETRO

Temp.50C pH 6.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces bulgaricus

Project Name: SUGAR
 Sample Name: 6.0-5H-50-0.3
 Vial: 39
 Injection: 1
 Channel: SATIN
 Date Acquired: 31/07/97 17:38:56
 Acq Meth Set: SUGAR_MS
 Processing Method: LINEAR_PM

Sample Type: Unknown
 Volume: 96.00
 Run Time: 50.0 min
 Date Processed: 16/08/97 11:37:22
 Dilution: 1.00000
 Chrom Type 2D
 Percent Unknowns 0.000



Report Method: AMOSTAS

Version: 2.10

For Sample: 5.0-36H-40-0.3

Vial: 52

Injection: 1

Channel: SATIN

File Name: SATIN

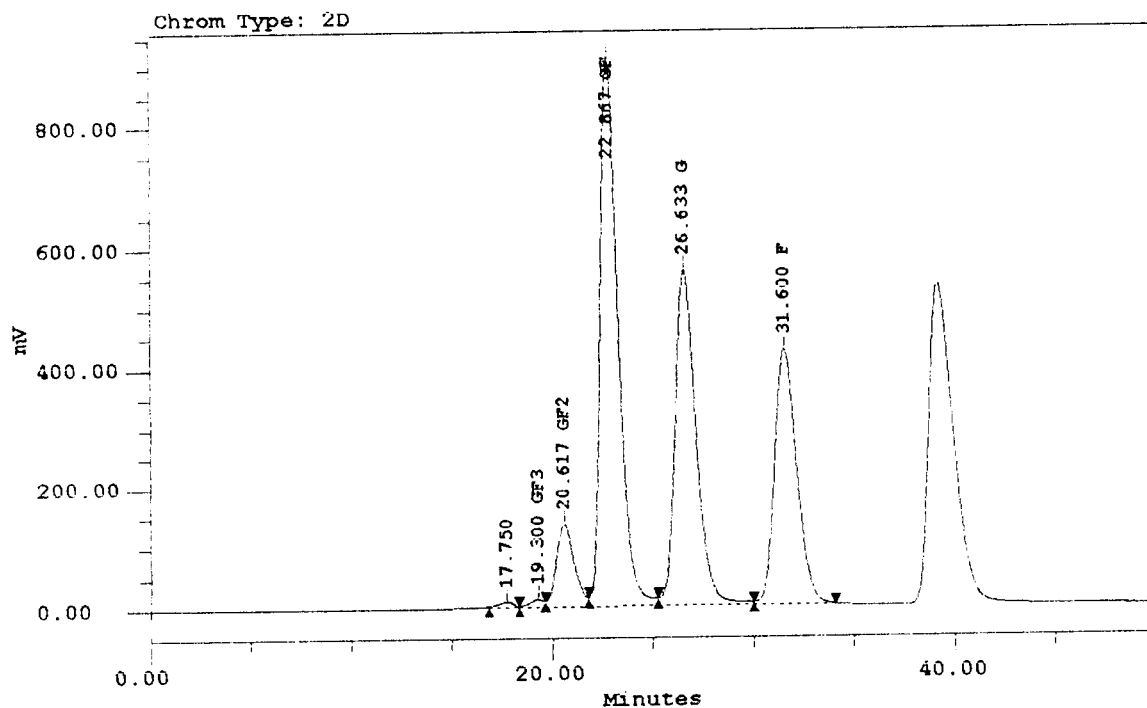
Processed: 16/08/97 13:06:41

Channel Descr: REFRACTOMETRIC

Temp: 40°C pH 5.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces bulgaricus

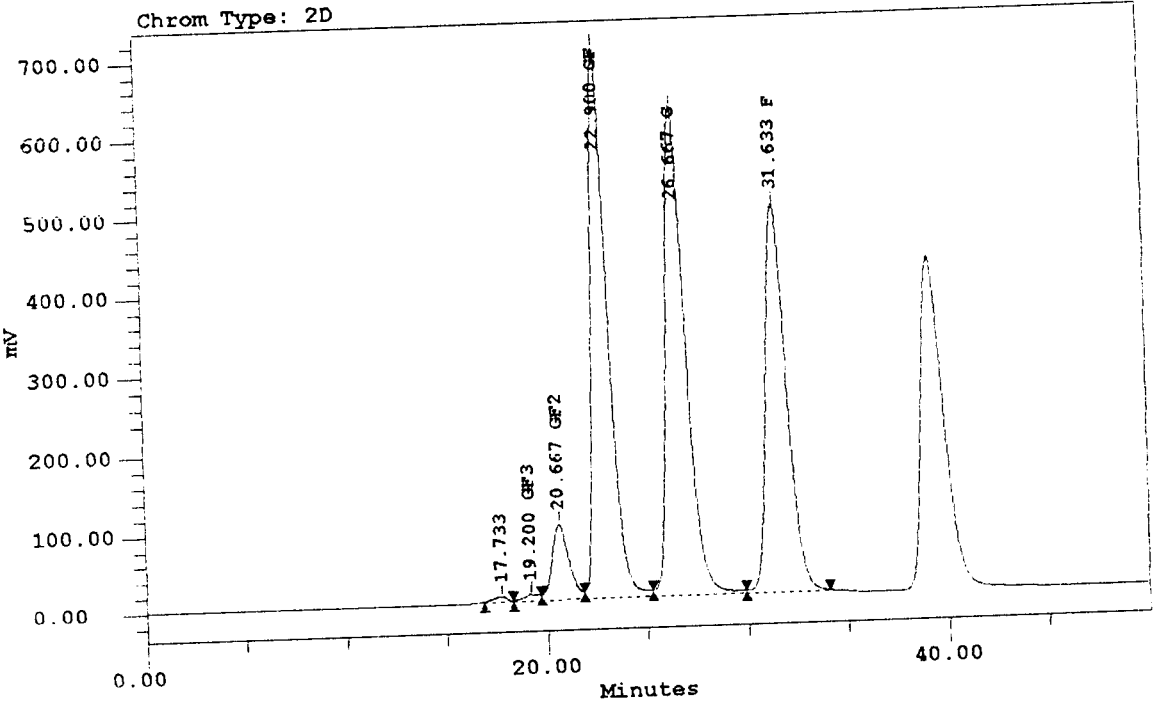
Project Name: SUGAR
Sample Name: 5.0 36H 40 0.3
Vial: 52
Injection: 1
Channel: SATIN
Date Acquired: 01/06/97 09:42:37
Acq Meth Set: SUGAR_MS
Processing Method: LINEAR PM

Sample Type: Unknown
Volume: 98.00
Run Time: 50.0 min
Date Processed: 16/08/97 13:06:41
Dilution: 1.00000
Chrom Type: 2D
Percent Unknowns: 0.270



Temp.40C pH 4.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces bulgaricus

Project Name:	SUGAR	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	4.0-36H-40-0.3	Volume:	98.00
Vial:	47	Run Time:	50.0 min
Injection:	1	Date Processed:	16/08/97 13:02:33
Channel:	SATIN	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	01/08/97 00:43:06	Chrom Type	2D
Acq Meth Set:	SUGAR_MS	Percent Unknowns	0.242
Processing Method:	LINEAR_PM		



Report Method: AMOSTAS

Version: 2.10

For Sample: 4.0-10H-50-0.3

Vial: 26

Injection: 1

Channel: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 16/08/97 11:33:50

Channel Descr: REFRACTOMETRO

Temp. 50C pH 4.0 Fluxo = 0.3 ml/min - Sacarose 50% - Kluyveromyces bulgaricus

Project Name: SUGAR
 Sample Name: 4.0-10H-50-0.3
 Vial: 26
 Injection: 1
 Channel: SATIN
 Date Acquired: 31/07/97 06:10:48
 Acq Meth Set: SUGAR_MS
 Processing Method: LINEAR_PM

Sample Type: Unknown
 Volume: 98.00
 Run Time: 50.0 min
 Date Processed: 16/08/97 11:33:50
 Dilution: 1.00000
 Chrom Type 2D
 Percent Unknowns 0.000

