

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE GLICOSILTRANSFERASE
DE Klebsiella sp E PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DE
SACAROSE**

Regina Tomie Uekane

Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato (f)

Parecer

Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida por Regina Tomie Uekane e aprovada pela Comissão Julgadora em 02-12-93.

Hélia Harumi Sato

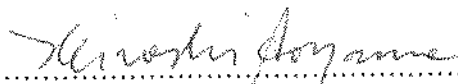
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

.....
Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(orientadora)



.....
Prof. Dr. Yong Kun Park
(membro)



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



.....
Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
(membro)

Campinas, 02 de *dezembro* de 1993

Em memória de meu pai,
pela amizade, compreensão e
incentivo em todos os mo-
mentos de minha vida.

Ao meu marido, Ricardo,
pela compreensão, estímulo e
alegria constantes.

À minha mãe,
pelo seu carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Hélia Harumi Sato, pela dedicada orientação, amizade e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Yong Kun Park, pela colaboração e importantes sugestões apresentadas durante toda a realização deste trabalho.

À Profa. Gláucia Maria Pastore pelos valiosos ensinamentos e colaborações prestados.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Dora, Eliane, e Paulo, pela constante cooperação e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Marina, Dong Koo, Roseli, Angelita, Marcolino, Patrícia, Marjorie, Gabriela, Erica, Masaharu e Romildo pela amizade, estímulo e ajuda.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e da Secretaria de Pós-Graduação, pela gentileza e atenção.

À todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para realização desta pesquisa.

ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. Materiais	10
3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos	10
3.1.2. Equipamentos	11
3.2. Métodos	12
3.2.1. Isolamento e Seleção de Microrganismo Produtores de Glicosiltransferase	12
3.2.1.1. Coleta de Amostras.....	12
3.2.1.2. Isolamento de Microrganismo.....	12
3.2.1.3. Seleção de Microrganismos Produtores de Glicosiltransferase	13
3.2.1.4. Cromatografia de açúcares em Papel.....	13
3.2.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Açúcares.....	14
3.2.1.6. Determinação da Atividade Enzimática.....	14
3.2.2. Identificação e conservação da Linhagem Produtora de Glicosiltransferase	14
3.2.3. Efeito da Concentração de Sacarose do Meio de Cultura na Produção de Glicosiltransferase	15

3.2.4. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 30°C e a 36°C	15
3.2.4.1. Preparação do Inóculo.....	16
3.2.4.2. Fermentação	16
3.2.4.3. Determinação do Crescimento do Microrganismo.....	16
3.2.5. Produção e Purificação da Glicosiltransferase.....	17
3.2.5.1. Produção da Glicosiltransferase.....	17
3.2.5.2. Purificação da Glicosiltransferase.....	18
3.2.5.2.1. Fracionamento da Glicosiltransferase com Sulfato de Amônio.....	18
3.2.5.2.2. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	18
3.2.5.2.3. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de CM-Celulose.....	19
3.2.6. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada.....	20
3.2.6.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	20
3.2.6.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima	20
3.2.6.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	21
3.2.6.4. Estabilidade Térmica da Enzima	21
3.2.6.5. Estudo da Relação Entre Tempo de Incubação e Conversão de Sacarose para Palatinose a 25°, 30° e 35°C.....	22
3.2.6.6. Efeito de Sais Minerais na Atividade Enzimática.....	22
3.2.6.7. Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática.....	23
3.2.6.8. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática.....	23
3.2.6.9. Determinação de Peso Molecular da Glicosiltransferase.....	24

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Glicosiltransferase.....	25
4.2. Identificação da Linhagem Produtora de Glicosiltransferase	26
4.3. Efeito da Concentração de Sacarose do Meio de Cultura na Produção de Glicosiltransferase.....	26
4.4. Relação Entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 30°C e a 36°C.....	27
4.5. Produção e Purificação da Glicosiltransferase.....	28
4.6. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada	29
4.6.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	29
4.6.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima	30
4.6.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	30
4.6.4. Estabilidade Térmica da Enzima.....	30
4.6.5. Relação Entre Tempo de Incubação e Conversão de Sacarose para Palatinose a 25°C, 30°C e 35°C.....	31
4.6.6. Efeito de Sais Minerais na Atividade Enzimática.....	31
4.6.7. Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática.....	32
4.6.8. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática.....	33
4.6.9. Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase.....	33
5. CONCLUSÕES	56
6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1 - Características Morfológicas, Bioquímicas e Fisiológicas da Linhagem <i>Klebsiella sp</i> n° 18.....	36
Tabela 2 - Efeito da Concentração de Sacarose do Meio de Cultura na Produção de Glicosiltransferase Pelo Microrganismo <i>Klebsiella sp</i> n° 18.....	37
Tabela 3 - Purificação de Glicosiltransferase de <i>Klebsiella sp</i> n° 18.....	38
Tabela 4 - Efeito de Sais Minerais na Atividade de Glicosiltransferase	39
Tabela 5 - Efeito de Inibidores na Atividade de Glicosiltransferase	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Cromatografia em Papel dos Açúcares Obtidos Após Fermentação da Linhagem n° 18 em Meio Contendo 4% de Sacarose a 30°C.....	42
Figura 2 - Cromatografia Líquida de Alta Pressão Ilustrando a Produção de Palatinose Após Fermentação do Microrganismo n° 18 em Meio de Cultura Contendo 4% de Sacarose a 30°C.....	43
Figura 3 - Estudo da Relação Entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Glicosiltransferase a 30°C.....	44
Figura 4 - Estudo da Relação Entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Glicosiltransferase a 36°C.....	45
Figura 5 - Fluxograma de Produção e Purificação de Glicosiltransferase de <i>Klebsiella sp</i> n° 18.....	46
Figura 6 - Cromatografia de Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	47
Figura 7 - Cromatografia de Glicosiltransferase em Coluna de CM-celulose.....	48
Figura 8 - Efeito do pH na Atividade de Glicosiltransferase.....	49
Figura 9 - Efeito do pH na Estabilidade de Glicosiltransferase.....	50

Figura 10 - Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	51
Figura 11 - Estabilidade Térmica da Glicosiltransferase.....	52
Figura 12 - Relação Entre Tempo de Incubação e Conversão de Sacarose para Palatinose a 25, 30 e 35°C.....	53
Figura 13 - Efeito da Concentração do Substrato Sacarose na Ativi- dade de Glicosiltransferase.....	54
Figura 14 - Relação Entre Volume de Eluição e Peso Molecular das Proteínas em Coluna de Sephadex G-200.....	55

RESUMO

Duzentas e cinquenta e oito linhagens de microrganismos foram isoladas de amostras de melão de cana-de-açúcar, frutas e flores, e testadas quanto a capacidade de converter a sacarose em palatinose. Entre estes microrganismos foi selecionada uma linhagem identificada como *Klebsiella sp* produtora de glicosiltransferase, que catalisa a conversão de sacarose em palatinose.

Estudou-se a produção e a caracterização bioquímica de glicosiltransferase intracelular da linhagem de *Klebsiella sp* n° 18. A enzima foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose. A glicosiltransferase apresentou atividade ótima a 35°C e na faixa de pH 6,0 a 6,6. O tratamento térmico da enzima purificada durante 1 hora a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C resultaram em 5,3%, 10,5%, 13,2%, 15,8%, 18,4%, 31,6%, 92,1% e 100% de inativação respectivamente. A conversão máxima de sacarose em palatinose foi 86% quando a enzima foi incubada em solução 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,5 durante 64 horas a 25°C. A atividade enzimática não foi afetada por CuSO₄, KCl, MgSO₄, FeCl₃ e Pb(CH₃COO)₂. Os sais MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, BaCl₂ e CoCl₂, inibiram fracamente a atividade de glicosiltransferase, porém, a enzima foi totalmente inibida por HgCl₂ e AgNO₃ na concentração 1 mM. A atividade enzimática foi inibida pelo reagente iodo na concentração 0,1; 1,0 e 10 mM, sugerindo que resíduos tirosina podem estar envolvidos na atividade de glicosiltransferase. Os reagentes p-cloromercuribenzoato e iodoacetamida na concentração 0,1, 1,0 e 10 mM, não inibiram a atividade enzimática. Os valores de Km e Vmáx da enzima purificada foram respectivamente 120 mM e 0,090 µmol de palatinose/ minuto.mg de proteína para o substrato sacarose. O peso molecular da glicosiltransferase foi estimado em 74.000 daltons, através de filtração em gel Sephadex G-200.

SUMMARY

Two hundred and fifty eight strains of microorganisms were isolated from sugar cane molasses, fruit and flower samples and examined for their capacity to convert sucrose in palatinose. From these microorganisms, one strain was selected and classified as *Klebsiella sp.* This bacteria produces the glucosyltransferase enzyme which catalyzes the conversion of sucrose to palatinose.

The production and biochemical characterization of intracellular glucosyltransferase of the strain *Klebsiella sp* n° 18 were studied. The enzyme was purified by fractionation with ammonium sulfate and DEAE-Sephadex A-50 and CM-cellulose column chromatographies. The glucosyltransferase has optimum activity at 35°C and pH 6.0 - 6.6. The thermal treatment of the purified enzyme for one hour at 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C and 55°C resulted in 5.3%, 10.5%, 13.2%, 15.8%, 18.4%, 31.6%, 92.1% and 100% inactivation, respectively. The maximum conversion of sucrose to palatinose was 86% when 4% sucrose solution in citrate-phosphate buffer pH 6,5 was incubated with the enzyme at 25°C for 64 hours. The enzyme activity was not affected by CuSO₄, MgSO₄, FeCl₃ and Pb(CH₃COO)₂. MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, BaCl₂ and CoCl₂ salts slightly inhibited the glucosyltransferase activity but, 1 mM of either HgCl₂ or AgNO₃ totally inhibited the enzyme. The enzymatic activity was inhibited by iodine reagent in the concentration of 0,1; 1,0 and 10 mM, suggesting that tyrosine groups may be involved in the glucosyltransferase activity. The p-chloromercuribenzoate and iodoacetamide reagents did not inhibit glucosyltransferase activity. The kinetic parameters Km and Vmax in relation to sucrose were 120 mM and 0.090 µmol of palatinose/ minute.mg protein, respectively. A molecular weight of 74,000 for the glucosyltransferase was estimated by Sephadex G-200 gel filtration.

1 - INTRODUÇÃO

A produção de açúcares alternativos a partir de sacarose tem grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica. Um açúcar que pode ser obtido a partir de sacarose por transformação enzimática é a isomaltulose (6-0-alfa-D-glicopiranosil-D-frutofuranose), um dissacarídeo redutor que apresenta ligação glicosídica alfa1,6 e pode ser obtido por transformação enzimática a partir de sacarose. A isomaltulose, também conhecida como palatinose, apresenta cerca de 37% da doçura da sacarose e possui propriedades físicas e organolépticas muito similares a sacarose.

Devido ao baixo potencial cariogênico, a palatinose é utilizada comercialmente no Japão, na produção de doces e gomas de mascar. A palatinose é também usada na produção de isomalte [alfa-D glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + alfa-D glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)] que apresenta baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e menor higroscopicidade quando comparado com outros açúcares álcoois como sorbitol, manitol e xilitol.

Linhagens de *Protaminobacter rubrum* [(MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, 1964)], *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982 e 1985), *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (LUND & WYATT, 1973) e *Serratia plymuthica* [(MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, 1964), (FUJI et alii, 1983), (MCALLISTER et alii, 1990)] tem sido descritas na literatura para a conversão de sacarose em palatinose, porém em geral foi observado a formação de outros açúcares durante o processo.

O presente trabalho visa o isolamento e seleção de microrganismo produtor de enzima glicosiltransferase capaz de converter a sacarose em palatinose com alto rendimento.

A preparação enzimática será purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografias em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose para a sua posterior caracterização bioquímica.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

STODOLA et alii (1952), durante o estudo da formação de dextrana a partir de sacarose, usando a dextranasacarase obtida pela fermentação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, isolaram dois novos açúcares como subprodutos da reação. Um destes compostos, foi identificado como sendo o dissacarídeo leucrose (5-0-alfa-D-glicopiranosil-D-frutose).

Posteriormente, SHARPE et alii (1954) (citado por SHARPE et alii, 1960) identificaram o outro açúcar como isomaltulose (6-0-alfa-D-glicopiranosil-D-frutose). Este dissacarídeo podia facilmente ser distinguido da isomaltose (6-0-alfa-D-glicopiranosil-D-glicose) pela cromatografia em papel, mas sua forma fenilosotriazólica foi idêntica à isomaltose, desse modo estabelecendo essencialmente sua estrutura como isomaltulose.

Dois anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores (STODOLA et alii, 1956) relatou novamente que a isomaltulose foi isolada como subproduto durante o processo de obtenção do dissacarídeo leucrose a partir de sacarose por ação da enzima dextranasacarase (sacarose: 1,6-alfa-D-glucana 6-alfa-D-glicosiltransferase E.C. 2415) produzida pelo microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F.

WEIDENHAGEN & LORENZ (1957) relataram a obtenção de 90% de conversão de sacarose em isomaltulose, durante um processo fermentativo, por ação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*. O produto foi denominado palatinose (citado por SHARPE et alii, 1960).

AVIGAD (1959) verificou a síntese de glicosilfrutoses pela ação de alfa-glicosidase obtida de levedura, em solução contendo 17,1% de sacarose e

18,0% de frutose, preparada em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,6, no qual também se adicionou invertase para a hidrólise total dos resíduos de sacarose. Após a remoção de hexoses livres, foi feita a purificação e análise dos oligossacarídeos formados. Foram obtidos seis tipos de glicosilfrutoses, sendo que o dissacarídeo isomaltulose foi o produto formado em maior quantidade. Na cromatografia de açúcares em papel, usando-se o revelador anilina-difenilamina, a isomaltulose produziu uma coloração amarelo-oliva.

SHARPE et alii (1960) descreveram o isolamento e estudo de algumas propriedades de isomaltulose formada durante a síntese enzimática de dextrana por ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Na cromatografia de açúcares em papel, quando revelada com o reagente uréia-ácido fosfórico, a isomaltulose apresentou uma mancha característica de dissacarídeos formados de frutose e quando a isomaltulose foi hidrolisada por aquecimento por 1 hora em HCl 0,25 N, a cromatografia em papel do hidrolisado mostrou quantidades relativamente iguais de glicose e frutose.

BOURNE et alii (1961) observaram que durante o cultivo de *Streptococcus bovis* em meio contendo 8,5% de sacarose, paralelamente à produção de dextrana, havia produção de diversos oligossacarídeos tais como isomaltose, isomaltotriose, 5-0-alfa-isomaltosil-D-frutose, isomaltotriulose, sendo que leucrose e isomaltulose eram produzidos em grande quantidade.

MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ (1964a e 1964b) (citado por MCALLISTER et alii, 1990) estudaram a síntese de isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* e *Protaminobacter rubrum* e sugeriram que a atividade envolvida era de uma isomaltulose transglicosilase, pois além da síntese de isomaltulose, a enzima catalizava a transferência de resíduos alfa-D-glicosil. Na presença de sacarose e manose ou arabinose havia formação de isomaltulose, alfa-D-glicosil-manose ou alfa-D-glicosil-arabinose. Os autores também relataram que a enzima de *Protaminobacter rubrum* era intracelular.

WALLENFELS et alii (1966) verificaram que 90 a 95% da enzima pululanase ligada à célula de *Aerobacter aerogenes*, linhagem atualmente classificada como *Klebsiella pneumoniae*, era extraída após agitação de 10 g de células frescas e úmidas em 100 ml de solução 0,1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio. (SDS).

SIDDIQUI & FURGALA (1967) isolaram e caracterizaram os oligossacarídeos presentes no mel e verificaram que isomaltulose é um componente presente no mel em quantidade aproximada de 1%.

LUND & WYATT (1973) relataram que quando linhagens de *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* G120 foram inoculadas em meio contendo peptona 1%, extrato de carne 0,4% e sacarose 4% e incubadas a 25°C por 3 dias sob agitação, ocorria a formação de dois compostos redutores, denominados I e II, que se acumulavam no meio de cultura. Após cromatografia em papel dos compostos purificados e revelação com anilina-difenilamina-ácido fosfórico, o componente I e o açúcar padrão palatinose apresentaram coloração verde-amarelada, característica de oligossacarídeos que apresentam ligação glicosídica alfa-1,6. Após hidrólise ácida do componente I com ácido sulfúrico 0,5 N durante 2 horas e análise dos produtos de hidrólise através de cromatografia em papel, os autores verificaram que havia formação de glicose e frutose em quantidades aproximadamente iguais.

KOBAYASHI & MATSUDA (1980) purificaram a dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides*, NRRL B-512 F, que catalisa a polimerização de moléculas de glicose, a partir do substrato sacarose, formando o polissacarídeo dextrana. Os autores relataram que a enzima apresentava atividade ótima em pH 6,0 e a 30°C. A dextranasacarase foi inibida por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração 0,5 mM e ativada por CaCl₂ (1 mM). Os sais CuCl₂, FeCl₃ e MnCl₂ na concentração 1 mM inibiram respectivamente 93%, 83% e 62% da atividade enzimática.

ROBERTS & HAYES (1980) verificaram que a palatinose era fracamente metabolizada por *Streptococcus mutans* e por microrganismos obtidos de placas dentárias e sugeriram que a palatinose era fracamente cariogênica (citado por MCALLISTER et alii, 1990).

CHEETHAM et alii (1982) descreveram a bioconversão de sacarose para isomaltulose pela bactéria *Erwinia rhapsodica*. Os autores relataram que a enzima responsável pela formação de isomaltulose era uma glicosiltransferase e estava localizada no espaço periplásmico. Esta enzima era mais ativa em pH 7,0 e a 30°C, e apresentava valor de Km em relação ao substrato sacarose igual a 0,35 M. A adição de nitrogênio, nutrientes ou outros açúcares na solução do substrato sacarose não aumentou a atividade da enzima. Os pesquisadores verificaram a formação de ácidos e de um dissacarídeo possivelmente 1-0-alfa-D-glicosilfrutose como subprodutos durante a fermentação da sacarose.

Pesquisadores da companhia japonesa Mitsui Sugar (SHIMIZU et alii, 1982) desenvolveram um método de produção industrial de palatinose a partir de sacarose empregando células de *Serratia plymuthica* NCIB 8285. Neste processo eram também formados oligossacarídeos diferentes da palatinose em pequenas quantidades (citado por FUJI et alii, 1983).

FUJI et alii (1983) descreveram o isolamento e caracterização de oligossacarídeos produzidos a partir de sacarose por ação da bactéria *Serratia plymuthica* NCIB 8285 e verificaram através da análise por cromatografia líquida de alta pressão que a palatinose era o principal produto formado na reação, correspondendo a 21,8% do total. A partir da identificação dos outros oligossacarídeos, os autores concluíram que a enzima de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 atuava na transferência de resíduos alfa-glicosil para grupo -OH do C₁ ou C₆ da molécula de frutose ou para grupo -OH do C₆ da molécula de glicose.

MACDONALD & DANIEL (1983) (citado por STRATER, 1987) em um estudo sobre a biodisponibilidade da isomaltulose utilizando ratos, relataram que a palatinose (20% do total da dieta) foi quase que totalmente hidrolisada no duodeno e a glicose e frutose liberadas foram reabsorvidas. Os autores sugeriram que a ingestão de palatinose não provoca nenhum tipo de distúrbio gastrointestinal.

TOPITSOGLOU et alii (1984), relataram que havia uma diminuição significativa na produção de ácidos e glucanas por microrganismos da placa dentária humana, após ingestão de isomaltulose comparado com a sacarose.

CHEETHAM et alii (1985) relataram a produção de isomaltulose utilizando células de *Erwinia rhapsontici* imobilizadas. A conversão máxima de sacarose para isomaltulose ocorreu quando o substrato foi ajustado para pH 7,0 com NaOH 0,1 M e a 30°C. Os pesquisadores citaram que a enzima que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose estava localizada no espaço periplásmico. Foi observado que além de isomaltulose, havia também a formação de subprodutos, embora em pequenas quantidades, principalmente de trehalulose (alfa-D-glicopiranosil-alfa-D-frutofuranosídeo). Neste mesmo trabalho, os autores também citaram algumas propriedades da isomaltulose: este dissacarídeo é solúvel em uma concentração de até 37 g/100 ml de água a 20°C; tem ponto de fusão na faixa de 118 - 122°C; apresenta uma doçura de cerca de 37% da sacarose, em uma concentração de 7% (p/v) em água; é estável à hidrólise ácida na faixa de pH 2,5 - 6,0; é prontamente hidrolisada pela enzima isomaltase do complexo sacarase-isomaltase localizado no intestino delgado humano e os monossacarídeos resultantes são metabolizados rapidamente.

BUCHHOLZ (1987) ressaltou a importância da síntese enzimática de oligossacarídeos e polissacarídeos a partir da sacarose. De acordo com o autor, existem várias possibilidades de obtenção de derivados de açúcar através de métodos biotecnológicos e enzimáticos. Como exemplo, destacou o uso de glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum* na conversão de sacarose em isomaltulose e sua posterior hidrogenação química em isomalte [alfa-D-

glicopiranosil-1,6-manitol (GPM) + alfa-D-glicopiranosil-1,6-sorbitol (GPS)], um açúcar não cariogênico e de baixo valor calórico.

A palatinose pode ser utilizada como precursor do açúcar-álcool isomalte. Neste processo, a palatinose, após cristalização, é hidrogenada quimicamente para isomalte, que é um adoçante não cariogênico e de reduzido valor calórico. O isomalte apresenta um poder adoçante de cerca de 45 - 60% da sacarose em solução aquosa a 20°C. É altamente resistente a aquecimento, modificações químicas e enzimáticas. Tem ponto de fusão na faixa de 145 - 150°C. Sua densidade e viscosidade são similares a sacarose. Em comparação com outros açúcares álcoois, tais como manitol, sorbitol e xilitol, o isomalte tem uma tendência maior para cristalização e menor higroscopicidade. É adequado para diabéticos por ser apenas parcialmente hidrolisado e absorvido no intestino delgado. (BOLLINGER, 1988).

IRWIN (1990) relatou as aplicações do isomalte. Devido às suas propriedades, o isomalte pode ser usado como substituto da sacarose em produtos alimentícios de baixa caloria e adequados para diabéticos. Na Europa, o isomalte está sendo empregado em produtos tais como chocolates, caramelos e gomas devido a característica não cariogênica. Em panificação, o isomalte pode substituir a sacarose na proporção 1:1. Pode ser usado também na preparação de sorvete, iogurte e uma variedade ampla de pudins e sobremesas. Formulações de isomalte, para uso em adoçantes, tem sido preparadas usando-se sacarina, ciclamatos, aspartame, acesulfame-K, separados ou combinados.

MCALLISTER et alii (1990) purificaram a enzima intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15.928, bactéria que foi selecionada pela sua capacidade de produzir isomaltulose a partir de sacarose. A produção máxima da enzima intracelular ocorreu após 16 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 40 g/l de sacarose, 10 g/l de peptona e 4,0 g/l de extrato Lab-Lemco. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 30°C. O valor de Km para o substrato sacarose foi 65,3 mM. A enzima converteu solução 40 g/L de

sacarose para isomaltulose com eficiência de 87%. A enzima apresentou PM de 79.500 e ponto isoelétrico em pH 9,0. Os autores relataram que existem dois tipos de enzimas produtoras de isomaltulose. A primeira dextransacarase, produz isomaltulose como sub produto durante a formação de dextrana, como é o caso da enzima de *Leuconostoc mesenteroides* e a segunda, produz isomaltulose como produto principal da sua ação sobre a sacarose, como é o caso da enzima intracelular de *Serratia plymuthica*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. - MATERIAIS

3.1.1 - REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS

Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais, solventes (Merck, Carlo Erba, Ecibra ou equivalente).

Reagentes específicos: p-cloromercuribenzoato, iodoacetamida, N-bromosuccinimida, L-cisteína, azida de sódio, dietilditiocarbamato de sódio, "blue dextran" 2000, albumina de soro bovino, albumina de ovo e lisozima comercializados pela Sigma.

Acúcares: sacarose, glicose (Ecibra), frutose (Merck) e palatinose (Mitsui Sugar Co., Tokyo).

Meio de Cultura: Agar (Biobrás), Peptona e Extrato de Carne (Difco).

Resinas: DEAE-Sephadex A-50 (Dietilaminoetil Sephadex A-50, Pharmacia Fine Chemicals Inc. Ref. 17-0180-01), CM-celulose (Carboximetil celulose, Sigma Ref. C2883), Sephadex G-200 (40-120 μ ; Pharmacia Fine Chemicals Inc. Ref. 17-0080-01).

Papel de Cromatografia e filtros: Papel Whatman nº 1 de 46 x 57 cm; filtros Millipore 0,45 μ Ref. HAWP-04700. Tubos de Collodium Sartorius de capacidade de retenção de proteínas de PM 13.200 daltons.

3.1.2 - EQUIPAMENTOS

- Agitador Incubador modelo Série 25 da New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.
- Banhos de água de temperatura controlada Fanem.
- Câmara Climática modelo 346 Fanem.
- Centrífuga Refrigerada Beckman modelo J2-21 e Fanem FR-22.
- Coletor de frações Buchler modelo Fractomette Alpha 200.
- Cromatógrafo Líquido Waters, com bomba modelo 6000 A, injetor U6K, detector de índice de refração R-401 e integrador HPX 87P.
- Espectrofotômetro Beckman modelo DU-70.
- Espectrofotômetro Coleman 295 E.
- Estufas Bacteriológicas Fanem.
- Potenciômetro Digimed DMPH-2.
- Sonicador Biosonik III da Bronwill Scientific.
- Ultrasonicador Biosonik IV da Bronwill Scientific.
- Ultrasonicador Homogeneizador Cole Parmer Serie 7401.

3.2. - MÉTODOS

3.2.1. - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE

Com o objetivo de selecionar microrganismos produtores de glicosiltransferase, que catalisa a conversão de sacarose em palatinose foram isolados e testados microrganismos de diferentes fontes conforme os métodos descritos a seguir.

3.2.1.1 - COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de melaço de cana-de-açúcar, frutas e flores foram coletadas de diferentes regiões do Estado de São Paulo e acondicionadas em sacos plásticos.

3.2.1.2. - ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Cerca de 0,5 - 1,0 g de amostra foram adicionadas em tubos de ensaio de 25 x 250 mm contendo 20 ml de água destilada, previamente esterilizados. Para o isolamento de bactérias, após agitação dos tubos, o líquido sobrenadante foi inoculado em placas contendo o seguinte meio de cultura esterilizado: 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne, 4% de sacarose e 2% de agar. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas para o desenvolvimento das bactérias. As colônias isoladas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o meio descrito acima previamente esterilizados e incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas.

3.2.1.3. - SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE

Os microrganismos isolados foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 25 ml contendo 10 ml de meio de cultura que consistia de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose, ajustado para pH 6,5 (LUND & WYATT, 1973). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm durante 72 horas a 30°C. Após esse período, os meios de cultura foram centrifugados a 11.000 x g durante 15 minutos e os sobrenadantes foram testados quanto a presença de palatinose através de cromatografia em papel. Se a palatinose estava presente, a massa celular era então lavada 3 vezes com água destilada, por centrifugação e, ressuspensa em 10 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0. A atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante do meio de cultura e na suspensão celular como descrito no item 3.2.1.6.

3.2.1.4. - CROMATOGRAFIA DE AÇÚCARES EM PAPEL

A cromatografia de açúcares em papel foi realizada em papel Whatman nº 1 previamente tratado com ácido bórico 0,25 M. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia descendente em papel foi acetato de etila : isopropanol : água destilada na proporção 6 : 3 : 1 (v:v), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi aproximadamente 15 horas para a fita de papel de 46 cm de comprimento. Utilizaram-se como padrões: sacarose, glicose, frutose e palatinose. Os açúcares foram revelados com anilina-difenilamina-ácido fosfórico (SCHWIMMER & BEVENUE, 1956).

3.2.1.5. - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS AÇÚCARES

As análises de carboidratos foram realizadas em cromatógrafo líquido Waters, utilizando-se coluna Zorba-NH₂ (4,6 x 250 mm) e fase móvel acetonitrila : água deionizada filtrada 75:25 (v:v) com fluxo de 1 ml/minuto. As amostras foram identificadas, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de sacarose e palatinose.

3.2.1.6. - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de glicosiltransferase foi determinada pelo aumento do poder redutor de solução contendo sacarose. Incubou-se a mistura de 900 µl de solução 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e 100 µl de solução de enzima a 35°C por 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1945), utilizando-se como padrão a palatinose. Uma unidade de glicosiltransferase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol palatinose/ min.ml de enzima a partir de sacarose sob as condições de ensaio.

3.2.2. - IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE GLICOSILTRANSFERASE

O microrganismo produtor de glicosiltransferase foi identificado através das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de acordo com MAC FADDIN (1980) e KRIEG & HOLT (1984).

Para a manutenção, o microrganismo foi cultivado em meio inclinado contendo 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de agar.

Após incubação durante 24 horas a 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de ensaio. A cultura foi conservada a 5°C, com repicagem a cada 2 meses.

3.2.3. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE

No estudo do efeito da concentração do carboidrato sacarose do meio de cultura na produção de glicosiltransferase, foram utilizados meios de cultura constituídos de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e concentrações de sacarose variáveis entre 0 a 4%. Os frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml de meio de cultura foram inoculados com 200 µl de suspensão homogênea do microrganismo em água destilada. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C durante 48 horas. Após o período de incubação determinou-se crescimento do microrganismo de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.3. Para a extração da enzima, uma amostra de 20 ml de meio de cultura foi centrifugada a 11.000 x g durante 10 minutos a 5°C e a massa celular foi ressuspensa em 20 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e submetida a oscilação ultrasônica a uma frequência de 40 KHz por 60 segundos em banho de gelo. A atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante obtido após rompimento das células de acordo com o método descrito no item 3.2.1.6.

3.2.4. - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMA A 30°C E A 36°C

A linhagem de *Klebsiella sp* n°18 que apresentou atividade de glicosiltransferase, selecionada dentre 258 microrganismos isolados de acordo com o item 3.2.1.3. foi utilizada para os estudos da produção de glicosiltransferase.

3.2.4.1. - PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para a preparação do inóculo, 20 ml de meio de cultura constituído de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose, ajustado para pH 6,5 (LUND & WYATT, 1973), contido em frasco de Erlenmeyer de 50 ml foi inoculado com a linhagem *Klebsiella sp* e incubado a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por um período de 24 horas.

3.2.4.2. - FERMENTAÇÃO

A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 50 ml sob agitação. Adicionou-se assepticamente 200 µL de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.4.1. a frascos contendo 20 ml de meio de cultura descrito no item anterior previamente esterilizados. A fermentação foi realizada a 30 e a 36°C em agitador rotatório a 200 rpm. As amostras de meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.2.4.3., e atividade enzimática, após lise da massa celular, como descrito no item 3.2.1.6.

3.2.4.3. - DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm (MALLETTTE, 1969). Após a fermentação, a amostra de 20 ml de meio de cultura foi centrifugada a 11.000 x g a 5°C durante 15 minutos e o precipitado obtido foi submetido a três lavagens sucessivas com água destilada nas mesmas condições descritas acima. A massa celular da última lavagem foi ressuspensa em 5 ml de água destilada e uma alíquota da suspensão foi diluída para se obter a leitura na faixa de linearidade do

método. A leitura de absorvância da amostra foi realizada contra água destilada a 660 nm.

3.2.5. - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE

3.2.5.1. - PRODUÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE

A produção de glicosiltransferase foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura, constituído de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose, ajustado para pH 6,5 (LUND & WYATT, 1973). Os frascos esterilizados foram inoculados com 1 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.4.1. e incubados em agitador rotatório à velocidade constante de 200 rpm, a 30°C durante 48 horas. Após a fermentação, o sobrenadante do meio de cultura e a massa celular foram separados por centrifugação a 11.000 x g durante 15 minutos a 5°C. Os carboidratos presentes no sobrenadante do meio de cultura foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, como descrito no item 3.2.1.5. Para a extração da enzima glicosiltransferase, a massa celular foi lavada três vezes com água deionizada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 10 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e rompidas por oscilação ultrasônica, por um período de 45 segundos a uma frequência de 40 KHz, em banho de gelo. A amostra foi centrifugada nas condições descritas acima. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi diluído em 50 ml de água destilada e utilizado para extração de glicosiltransferase com descrito a seguir no item 3.2.5.2. A atividade de glicosiltransferase no sobrenadante foi determinada de acordo com o item 3.2.1.6. A concentração de proteína das soluções enzimáticas, nas diversas etapas de purificação, foi determinada de acordo com o método de LOWRY (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.2.5.2. - PURIFICAÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE

3.2.5.2.1. - FRACIONAMENTO DA GLICOSILTRANSFERASE COM SULFATO DE AMÔNIO

A amostra de 50 ml de sobrenadante contendo glicosiltransferase obtida de acordo com o item 3.2.5.1. foi saturada com sulfato de amônio a 80% e a mistura mantida a 5°C durante 15 horas. O precipitado foi separado por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos a 5°C, dialisado contra água destilada a 5°C durante 48 horas e, em seguida, contra tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 a 5°C durante 48 horas. A amostra de enzima dialisada foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima e o sobrenadante denominado preparação bruta da enzima foi percolado em coluna de DEAE-Sephadex A-50 de acordo com as condições descritas a seguir.

3.2.5.2.2. - CROMATOGRAFIA DA GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50

Tratou-se previamente 20 g de DEAE-Sephadex A-50 com 500 ml de NaOH 0,5 N, filtrou-se em lã de vidro e lavou-se com água destilada para a remoção do NaOH. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de HCl 0,5 N, lavada com água destilada para a remoção do HCl e, finalmente, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 6,0.

A solução enzimática de glicosiltransferase obtida no item 3.2.5.2.1. foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A-50 de 2,5 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento, e equilibrada com tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,0. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 70 ml de tampão citrato fosfato 0,05 M pH

6,0 e quantidades de 100 ml de tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,0 contendo concentrações de 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,4 M e 0,5 M de NaCl consecutivamente; frações de 5,5 ml foram coletadas a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o item 3.2.1.6. As frações contendo atividade de glicosiltransferase foram reunidas. Após diálise contra água destilada durante 24 horas a 5°C, a solução enzimática foi concentrada por filtração em tubos de Collodium com capacidade de retenção de proteínas de PM 13.200 daltons e aplicada em coluna de CM-celulose de acordo com o método descrito a seguir.

3.2.5.2.3. - CROMATOGRAFIA DA GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE CM-CELULOSE

Cerca de 30 g de CM-celulose foi tratada com 500 ml de HCl 0,5 N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para a remoção do HCl. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de NaOH 0,5 N, lavada com água destilada para remoção do NaOH e com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0.

A amostra de solução enzimática obtida de acordo com o método descrito no item 3.2.5.2.2. foi aplicada em coluna de CM-celulose de 2,5 cm de diâmetro x 35 cm de comprimento. Iniciou-se a eluição com 100 ml de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, seguida de aplicação de 200 ml do mesmo tampão contendo concentrações crescentes de NaCl (0,1 M e 0,2 M); frações de 5,5 ml foram coletadas a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm e a atividade de glicosiltransferase foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.6. As frações contendo atividade de glicosiltransferase foram reunidas. A solução enzimática foi dialisada contra água destilada durante 24 horas a 5°C, liofilizada e conservada em congelador.

3.2.6. - CARACTERIZAÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE PURIFICADA

Para a caracterização da glicosiltransferase purificada foi utilizada a preparação enzimática obtida de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.5.2.

3.2.6.1. - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 100 µl de solução de glicosiltransferase purificada contendo 0,058 unidades e 900 µl de solução de sacarose 4% preparada em diferentes sistemas tampões, que foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato pH 2,6 a 7,0 e tampão fosfato de sódio pH 5,7 a 8,0 na concentração 0,1 M. As misturas de reação foram incubadas a 35°C em banho de água termostaticado por 20 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1945), sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.2. - EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade da enzima, 100 µl de solução de glicosiltransferase purificada previamente diluída em solução tampão 0,1 M de diferentes valores de pH, contendo 0,030 unidades, foi pré-incubada durante 24 horas a 5°C. Foram utilizados os sistemas tampões citrato-fosfato pH 2,6 a 7,0 e fosfato de sódio pH 5,7 a 8,0. A atividade residual foi determinada pela adição de 900 µl de sacarose 4% em tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 6,0 às soluções enzimáticas e as misturas de reação foram incubadas a 35°C durante 20 minutos. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de

SOMOGYI-NELSON (1945), sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.3. - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 900 µl de solução 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 e 100 µl de solução de glicosiltransferase purificada contendo 0,058 unidades. A mistura de reação foi incubada a diferentes temperaturas entre 25°C e 60°C durante 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1945) e calculados como descrito no item 3.2.1.6., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.4. - ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA

Para o estudo da termoestabilidade da enzima, amostras de 100 µl de solução de glicosiltransferase purificada em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 contendo 0,040 unidades foram adicionadas em tubos com tampa e pré-incubados em diferentes temperaturas entre 10°C e 55°C durante 1 hora, 3 horas e 5 horas. Após o tratamento térmico, os tubos foram colocados em banho de gelo e a atividade residual foi determinada, acrescentando-se 900 µl da solução 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.6. Considerou-se a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.5. - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONVERSÃO DE SACAROSE PARA PALATINOSE A 25°C, 30°C E 35°C

A conversão de sacarose em palatinose foi investigada pela incubação, em balões volumétricos de 50 ml, de 9 ml de solução de sacarose 4% em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,5 e 1 ml de solução de glicosiltransferase purificada contendo 0,15 unidades, a 25°, 30° e 35°C. Retirou-se alíquotas após determinados tempos e determinou-se a concentração de açúcares redutores de acordo com o método de SOMOGYI-NELSON (1945).

3.2.6.6. - EFEITO DE SAIS MINERAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado dentro da faixa de concentração onde não havia interferência com o método de determinação de atividade. Para o estudo do efeito de sais minerais na atividade de glicosiltransferase, o sistema de reação foi constituído de 800 µl de solução de sacarose 4% em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, 100 µl de solução enzimática contendo 0,058 unidades e 100 µl de solução contendo um dos seguintes compostos: CuSO₄, KCl, MgSO₄, Pb(CH₃COO)₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, CoCl₂, FeCl₃, HgCl₂ e AgNO₃ na concentração final de 1 mM. Após 20 minutos de incubação a 35°C, os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1945), utilizando-se como branco a mistura de tempo zero de reação.

3.2.6.7. - EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito de inibidores de enzimas foi verificado semelhantemente ao efeito de sais minerais na atividade enzimática. Para o estudo do efeito de inibidores na atividade de glicosiltransferase, o sistema de reação foi constituído de 800 µl de solução 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, 100 µl de solução enzimática contendo 0,058 unidades e 100 µl de solução de um dos seguintes reagentes: azida de sódio, dietilditiocarbamato de sódio, arseniato de sódio, L-cisteína, ácido etilenodiaminotetracético, iodoacetamida, p-cloromercuribenzoato, N-bromosuccinimida e iodo na concentração de 0,1; 1 e 10 mM. A atividade residual foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.6. utilizando-se como branco a mistura de reação em tempo zero. No teste de inibição pelos reagentes ácido etilenodiaminotetracético e iodo, a medida da atividade enzimática foi realizada após diálise da solução enzimática contra tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 durante 24 horas para que não houvesse interferência dos reagentes na determinação de açúcares redutores pelo método SOMOGYI-NELSON (1945).

3.2.6.8. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o estudo do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 100 µl de solução enzimática contendo 0,058 unidades e 900 µl de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, contendo diferentes concentrações de sacarose. As misturas de reação foram incubadas durante 20 minutos em banho de água termostaticado a 35°C e a atividade de glicosiltransferase foi determinada de acordo com o item 3.2.1.6. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas segundo o sistema gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934).

3.2.6.9. - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA GLICOSIL-TRANSFERASE

A enzima teve o seu peso molecular estimado por filtração em coluna de gel Sephadex G-200, conforme metodologia de ANDREWS (1965). As proteínas albumina de soro bovino, albumina de ovo e lisozima de pesos moleculares 67.000, 43.000 e 14.000 respectivamente foram utilizadas como padrões. Previamente, 50 g de Sephadex G-200 foi entumescida com 2 litros de solução KCl 0,1 M durante 2 dias a 10°C e em seguida equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo KCl 0,1 M. As proteínas padrões e a glicosiltransferase purificada e liofilizada foram dissolvidas em 3 ml de solução tampão e percoladas em coluna de 2,0 cm de diâmetro x 100 cm de comprimento de Sephadex G-200; frações de 4 ml foram coletadas a cada 15 minutos. A coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão pelo uso de "Blue Dextran" 2000.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE

Após o isolamento de 258 linhagens de microrganismos foi selecionada a linhagem de bactéria nº 18, produtora de glicosiltransferase, de acordo com o método descrito no item 3.2.1.3. A Figura 1 ilustra a cromatografia em papel dos açúcares presentes no sobrenadante do meio de cultura após a fermentação da linhagem nº 18 em meio de cultura contendo sacarose. Observa-se a presença de composto de coloração amarelo oliva característica de oligossacarídeos que apresentam ligação glicosídica alfa-1,6, após reação com anilina-difenilamina-ácido fosfórico (SCHWIMMER & BEVENUE, 1956).

BUCHHOLZ (1987) relatou que a glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum* catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose (6-O-alfa-D-glicopiranosil-D-frutofuranose) também conhecida como palatinose. Verificou-se através da cromatografia líquida de alta pressão (Figura 2) que a linhagem nº 18 converte a sacarose em isomaltulose; não foi detectada a presença de glicose, frutose e outros oligossacarídeos no sobrenadante do meio de cultura. Os açúcares foram identificados por comparação do tempo de retenção de açúcares padrões. Os carboidratos padrões sacarose e isomaltulose apresentaram tempos de retenção 17,64 e 18,82 minutos respectivamente.

A glicosiltransferase da bactéria nº 18 pode ser classificada como E.C.2.4.1. _ Hexosiltransferase (DIXON & WEBB, 1989).

4.2. - IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE GLICOSIL-TRANSFERASE

A linhagem nº 18, produtora de glicosiltransferase intracelular, isolada de manga (*Mangifera indica* L.), foi identificada como *Klebsiella sp.* As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da linhagem *Klebsiella sp* nº 18 estão ilustradas na Tabela 1.

Linhagens de *Protaminobacter rubrum* (MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, 1964a e 1964b), *Serratia plymuthica* [MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ (1964a e 1964b); SHIMIZU et alii (1982); FUJI et alii (1983); MCALLISTER et alii (1990)], *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (LUND & WYATT, 1973) e *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982 e 1985) tem sido descritas na literatura para aplicação na produção de isomaltulose a partir de sacarose por processos fermentativos ou enzimáticos.

4.3. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE

O estudo do efeito da concentração do carboidrato sacarose do meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem de *Klebsiella sp* nº 18 foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.3. (Tabela 2) Foi obtido maior produção de glicosiltransferase em meio de cultura contendo 4% de sacarose. Para a síntese de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* nº 18 é necessária a presença de sacarose.

4.4. - RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMA A 30°C E A 36°C

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella sp* n° 18 foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.

As Figuras 3 e 4 ilustram respectivamente a relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase a 30°C e a 36°C.

Verificou-se que a glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 é produzida na fase exponencial de crescimento. Na fermentação a 30°C a produção de glicosiltransferase intracelular atingiu a atividade máxima de 0,167 unidades/ml após 24 horas de fermentação, permanecendo constante até 32 horas aproximadamente. Após este período foi observado diminuição da atividade da enzima intracelular, sendo que após 80 horas de fermentação a atividade foi de aproximadamente 0,097 unidades/ml. Verificou-se que a enzima não é liberada no meio extracelular após 85 horas de fermentação. WALLENFELS et alii (1966) utilizaram 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para liberar a pululanase ligada à célula de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*), contudo a glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 não foi liberada após tratamento da massa celular com SDS 0,1%.

Na fermentação a 36°C a produção de glicosiltransferase intracelular alcançou a atividade máxima de 0,082 unidades/ml após 24 horas de fermentação diminuindo rapidamente após 32 horas de fermentação. Não foi observado atividade de glicosiltransferase extracelular.

MCALLISTER et alii (1990) relataram que a produção máxima da enzima intracelular pela linhagem *Serratia plymuthica* ATCC 15928 ocorreu após 16 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 40 g/l de sacarose, 10 g/l de peptona e 4,0 g/l de extrato Lab-Lemco. Os autores citaram que a enzima de *Protaminobacter rubrum* estudada por MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ (1964) também é uma enzima intracelular. CHEETHAM et alii (1985) utilizando células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* para produção de isomaltulose relataram que a enzima responsável pela formação de isomaltulose está localizada no espaço periplásmico das células.

4.5. - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE

A produção e purificação de glicosiltransferase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

O fluxograma de produção e purificação de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* está apresentado na Figura 5. A enzima intracelular foi obtida após tratamento da massa celular por oscilação ultrasônica durante 45 segundos a uma frequência de 40 KHz utilizando-se o equipamento Biosonik IV da Bronwill Scientific. Foram testados os equipamentos Biosonik III da Bronwill Scientific e Ultrasonicador Homogeneizador Cole Parmer Serie 7401 para a lise da parede celular, no intervalo de tempo entre 40 e 150 segundos a uma frequência de 30 a 50 KHz, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

O sobrenadante obtido após rompimento das células por oscilação ultrasônica apresentou uma atividade específica de 0,014 unidades/ mg de proteína. A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos durante as etapas de purificação. No fracionamento da preparação bruta da glicosiltransferase em coluna de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0, a enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 contendo

NaCl 0,1 M (Figura 6). Após esta etapa foi obtida uma atividade específica de 0,091 unidade/ mg de proteína. Na etapa subsequente de purificação, a glicosiltransferase não foi adsorvida em coluna de CM-celulose, enquanto que materiais pigmentados e algumas proteínas foram adsorvidos (Figura 7). A enzima foi purificada 12,1 vezes após fracionamento com sulfato de amônio seguido de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e de CM-celulose. A glicosiltransferase purificada apresentou atividade específica de 0,17 unidades/ mg de proteína.

MCALLISTER et alii, (1990) purificaram a enzima intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose, cerca de 25 vezes através de tratamento da preparação bruta com sulfato de estreptomicina, diálise e cromatografia em coluna de Bio-Gel A equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0.

4.6. - CARACTERIZAÇÃO DA GLICOSILTRANSFERASE PURIFICADA

As características bioquímicas da glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 foram determinadas como descrito no item 3.2.6.

4.6.1. - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito do pH na atividade de glicosiltransferase foi determinado de acordo com o item 3.2.6.1. A Figura 8 mostra que a enzima de *Klebsiella sp* apresenta maior atividade na faixa de pH 6,0 a 6,6 em tampão citrato-fosfato. A enzima purificada de *Serratia plymuthica* (MCALLISTER et alii, 1990) apresentou atividade ótima em pH 6,0. A glicosiltransferase de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982) mostrou maior atividade em pH 7,0 a 30°C.

4.6.2. - EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado conforme o item 3.2.6.2. A Figura 9 ilustra o efeito do pH na estabilidade da enzima. A glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 apresentou-se mais estável na faixa de pH 5,5 a 6,6 em tampão citrato-fosfato, sendo inativada em pH inferiores a 4,6 após 24 horas de incubação a 5°C. CHEETHAM et alii (1985) utilizando células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* para produção de isomaltulose relataram que a enzima mostrou-se mais estável na faixa de pH 4,0 a 4,5.

4.6.3. - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na atividade de glicosiltransferase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.3. A Figura 10 mostra que a glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 apresenta atividade ótima à 35°C. As glicosiltransferases obtidas de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982) e *Serratia plymuthica* (MCALLISTER et alii, 1990) descritas na literatura apresentaram atividade ótima a 30°C.

4.6.4. - ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA

O estudo da influência da temperatura na estabilidade da glicosiltransferase foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.6.4. A incubação da glicosiltransferase purificada de *Klebsiella sp* n° 18 em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0 a 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C durante 1 hora, na ausência de substrato resultaram em 0%, 5,3%, 10,5%, 13,2%, 15,8%, 18,4%, 31,6%, 92,1% e 100% de inativação, respectivamente. Verificou-se também que após 3 horas de tratamento térmico da

enzima nas temperaturas de 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°C, a inativação foi de 0%, 5,3%, 13,2%, 15,8%, 34,2%, 52,6%, 76,3%, 100% enquanto que após 5 horas de incubação a inativação foi de 2,6%, 10,5%, 15,8%, 21,1%, 36,8%, 52,6%, 84,2% e 100%, respectivamente. Os resultados estão ilustrados na Figura 11. A enzima é termosensível, sendo inativada rapidamente em temperaturas superiores a 30°C após 3 horas de incubação na ausência de substrato. Não foi encontrado dados quanto a estabilidade térmica de glicosiltransferases de outros microrganismos produtores de isomaltulose a partir de sacarose descritos na literatura para comparação.

4.6.5. - RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONVERSÃO DE SACAROSE PARA PALATINOSE A 25°C, 30°C E 35°C

O efeito da temperatura e do tempo de incubação na conversão de sacarose para palatinose foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.5. Os resultados deste estudo estão ilustrados na Figura 12. A conversão máxima de sacarose em palatinose foi 86% quando a enzima foi incubada a 25°C por 64 horas e pH 6,5. Este resultado foi semelhante ao encontrado por MCALLISTER et alii (1990) com a enzima intracelular de *Serratia plymuthica*, que converteu sacarose para isomaltulose com uma eficiência de 87%. WEIDENHAGEN & LORENZ (1957) obtiveram 90% de conversão de sacarose em isomaltulose (citado por SHARPE et alii, 1960).

4.6.6. - EFEITO DE SAIS MINERAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito de sais minerais na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 foi realizado conforme as condições descritas no item 3.2.6.6. Verificou-se que a presença de CuSO₄, KCl, MgSO₄, FeCl₃ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração 1 mM não afetaram a atividade de glicosiltransferase da linhagem

Klebsiella sp n° 18. Os sais $MnCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $BaCl_2$ e $CoCl_2$, inibiram levemente a atividade de glicosiltransferase. Por outro lado, $HgCl_2$ e $AgNO_3$ inibiram completamente a atividade da enzima (Tabela 4).

KOBAYASHI & MATSUDA (1980) relataram que a dextrana-sacarase ou glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F que catalisa a formação de dextrana a partir de sacarose foi ativada por $CaCl_2$ (1 mM) e inibida pelos sais $CuCl_2$, $FeCl_3$ e $MnCl_2$ na concentração 1 mM.

Não foi encontrado na literatura dados sobre o efeito de sais minerais na atividade de glicosiltransferase de microrganismos que catalisam a conversão de sacarose em palatinose como produto principal.

4.6.7. - EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito de inibidores na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.7. Verificou-se que os reagentes azida de sódio, dietilditiocarbamato de sódio, arseniato de sódio, L-cisteína e N-bromosuccinimida na concentração de 0,1, 1,0 e 10 mM não influenciaram a atividade de glicosiltransferase. A atividade enzimática de glicosiltransferase da linhagem *Klebsiella sp* n° 18 não foi influenciada pela presença dos reagentes p-cloromercuribenzoato e iodoacetamida na concentração de 0,1, 1,0 e 10 mM, sugerindo que a enzima não possui grupamentos sulfidrílicos essenciais para a sua atividade catalítica. O reagente iodo na concentração de 0,1; 1 e 10 mM inibiu a enzima, resultando em 43%, 82% e 87,7% de inibição respectivamente, sugerindo desse modo que resíduos de tirosina podem ser importantes para a atividade enzimática (Tabela 5). A glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n°18 não foi inibida por EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) na concentração 10 mM enquanto que a dextranasacarase ou glicosiltransferase que catalisa a síntese de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F foi

inibida por EDTA (0,5 mM) e ativada por CaCl₂ (1 mM) (KOBAYASHI & MATSUDA, 1980). Não foi encontrado na literatura dados sobre estudos de inibição de glicosiltransferase de microrganismos, que convertem a sacarose em palatinose.

4.6.8. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da concentração do substrato sacarose na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18, determinado conforme as condições descritas no item 3.2.6.8., está ilustrado na Figura 13. A constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima (V_{máx}) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934), obtendo-se os valores de 120 mM de sacarose e 0,090 µmol de palatinose/ min.mg de proteína, respectivamente.

As glicosiltransferases obtidas de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982) e *Serratia plymuthica* (MCALLISTER et alii, 1990) apresentaram respectivamente valores de Km 350 mM e 65,3 mM para o substrato sacarose. Estes resultados indicam que a enzima de *Klebsiella sp* n° 18 apresenta menor afinidade ao substrato sacarose do que a glicosiltransferase de *Serratia plymuthica*, porém maior afinidade a sacarose em relação a glicosiltransferase de *Erwinia rhapontici*.

4.6.9. - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA GLICOSIL-TRANSFERASE

O peso molecular da glicosiltransferase purificada da linhagem de *Klebsiella sp* n° 18 foi estimado em 74.000 daltons através da filtração em gel Sephadex G-200 de acordo com o método descrito no item 3.2.6.9. A Figura 14

mostra a relação entre volume de eluição e peso molecular das proteínas em coluna de Sephadex G-200.

MCALLISTER et alii (1990) relataram que a enzima intracelular purificada de *Serratia plymuthica*, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose, apresentou peso molecular de 79.500 daltons, estimado por filtração em gel Sephadex G-200.

TABELAS

Tabela 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DA LINHAGEM *Klebsiella sp* n° 18

Bastonete Gram -	Fenilalanina deaminase -
Motilidade -	Ornitina descarboxilase -
Produção de Indol -	Lisina descarboxilase +
Nitrato +	Arginina descarboxilase -
Citrato +	
H ₂ S em Meio TSI -	
Teste de Voges Proskauer +	Formação de ácido a partir de:
Teste de Vermelho de Metila -	Arabinose +
Catalase +	Glicose +
Urease +	Inositol +
Oxidase -	Lactose +
Liquefação de Gelatina -	Maltose +
	Manitol +
	Sorbitol +
	Sacarose +
	Xilose +

Tabela 2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELO MICRORGANISMO *Klebsiella sp* n° 18

Concentração de Sacarose (%)	Massa Celular (Abs. 660 nm)	Atividade de glicosil-transferase (Unidades de Atividade/ml de Meio de Cultura)
0,0	0,39	0,000
0,5	0,33	0,067
1,0	0,36	0,115
2,0	0,53	0,139
3,0	0,54	0,147
4,0	0,56	0,158

Tabela 3 - PURIFICAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE DE *Klebsiella sp* n° 18

ETAPA DE PROCEDIMENTO	Volume (ml)	Unidade/ml	Atividade Total Unidades	Proteína mg/ml	Atividade Específica (Unidades/mg Proteína)	Purificação	% Recuperação
SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS (APÓS OSCILAÇÃO ULTRASÔNICA)	50,0	2,95	147,50	205,5	0,014	1,00	100,00
FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO	15,0	7,00	105,00	470,0	0,015	1,07	71,18
CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50	55,0	0,21	11,55	2,3	0,091	6,50	7,83
CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CM-CELULOSE	16,5	0,58	9,57	3,4	0,170	12,10	6,49

Tabela 4 - EFEITO DE SAIS MINERAIS NA ATIVIDADE DE GLICOSIL-TRANSFERASE

Sais Minerais	Concentração	Atividade Residual (%)
CuSO ₄	1 mM	100,0
KCl	1 mM	100,0
MgSO ₄	1 mM	100,0
Pb(CH ₃ COO) ₂	1 mM	100,0
FeCl ₃	1mM	100,0
MnCl ₂	1 mM	96,0
CaCl ₂	1 mM	96,0
ZnCl ₂	1 mM	96,0
BaCl ₂	1 mM	96,0
CoCl ₂	1 mM	96,0
HgCl ₂	1 mM	0,0
AgNO ₃	1 mM	0,0

Tabela 5 - EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DE GLICOSIL-TRANSFERASE

Reagente	Concentração mM	Atividade Residual %
Ácido Etilenodiamino- tetracético	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
p-Cloromercuribenzoato	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
Iodoacetamida	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
Azida de Sódio	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
Dietilditiocarbamato de Sódio	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
Arseniato de Sódio	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
L-Cisteína	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
N-Bromosuccinimida	0,1	100
	1,0	100
	10,0	100
Iodo	0,1	57
	1,0	18
	10,0	12,3

FIGURAS

Figura 1 - CROMATOGRAFIA EM PAPEL DOS AÇÚCARES OBTIDOS APÓS FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM N° 18 EM MEIO CONTENDO 4% DE SACAROSE A 30°C

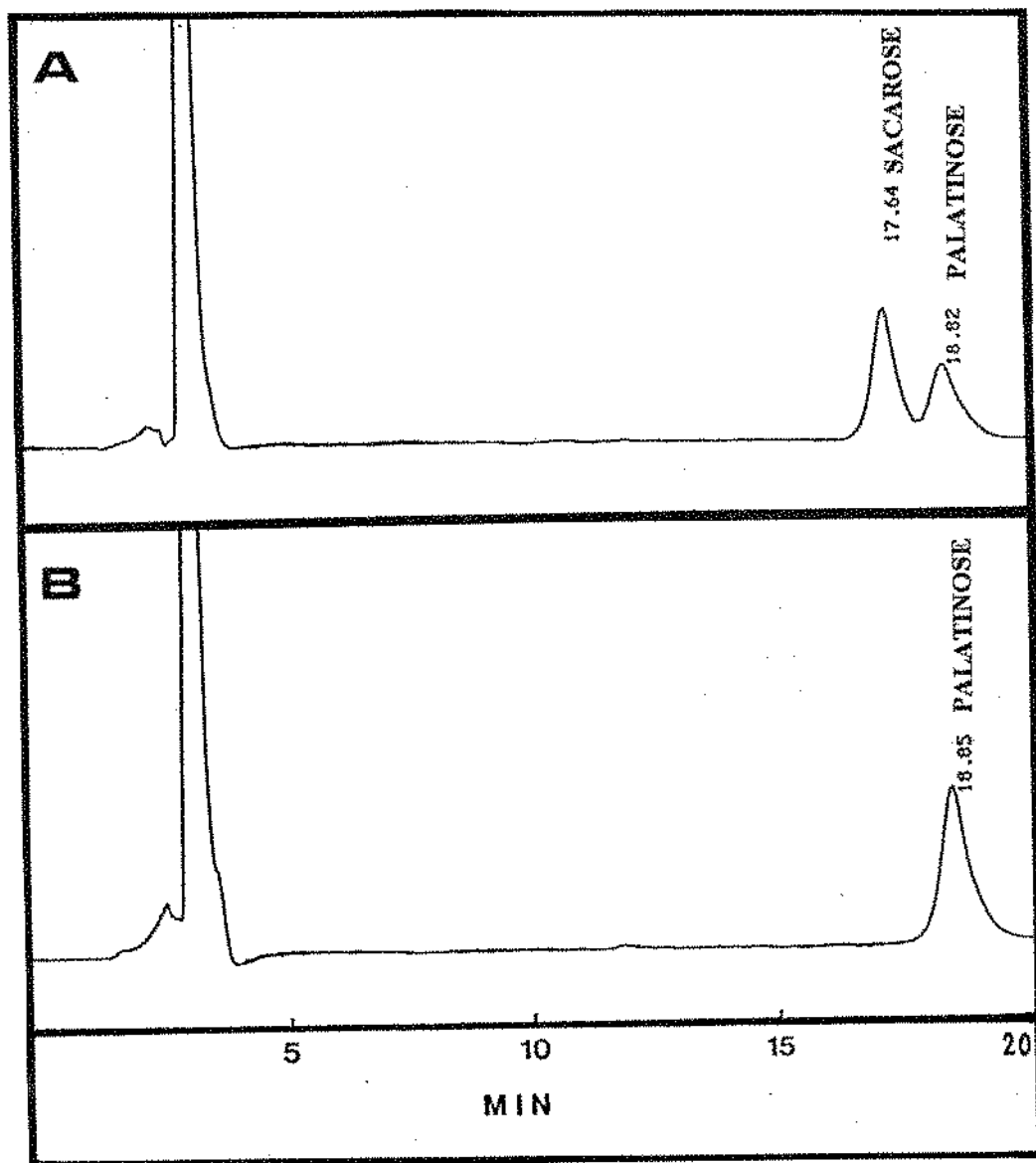


1 - Açúcar padrão: glicose

2 - Açúcar padrão: frutose

3 - Açúcar padrão: sacarose

Figura 2 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO ILUSTRANDO A PRODUÇÃO DE PALATINOSE APÓS FERMENTAÇÃO DO MICRORGANISMO Nº 18 EM MEIO DE CULTURA CONTENDO 4% DE SACAROSE A 30°C



A - Sobrenadante do meio de cultura após 24 horas de fermentação do microrganismo nº 18

B - Sobrenadante do meio de cultura após 48 horas de fermentação do microrganismo nº 18

Figura 3 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 30°C

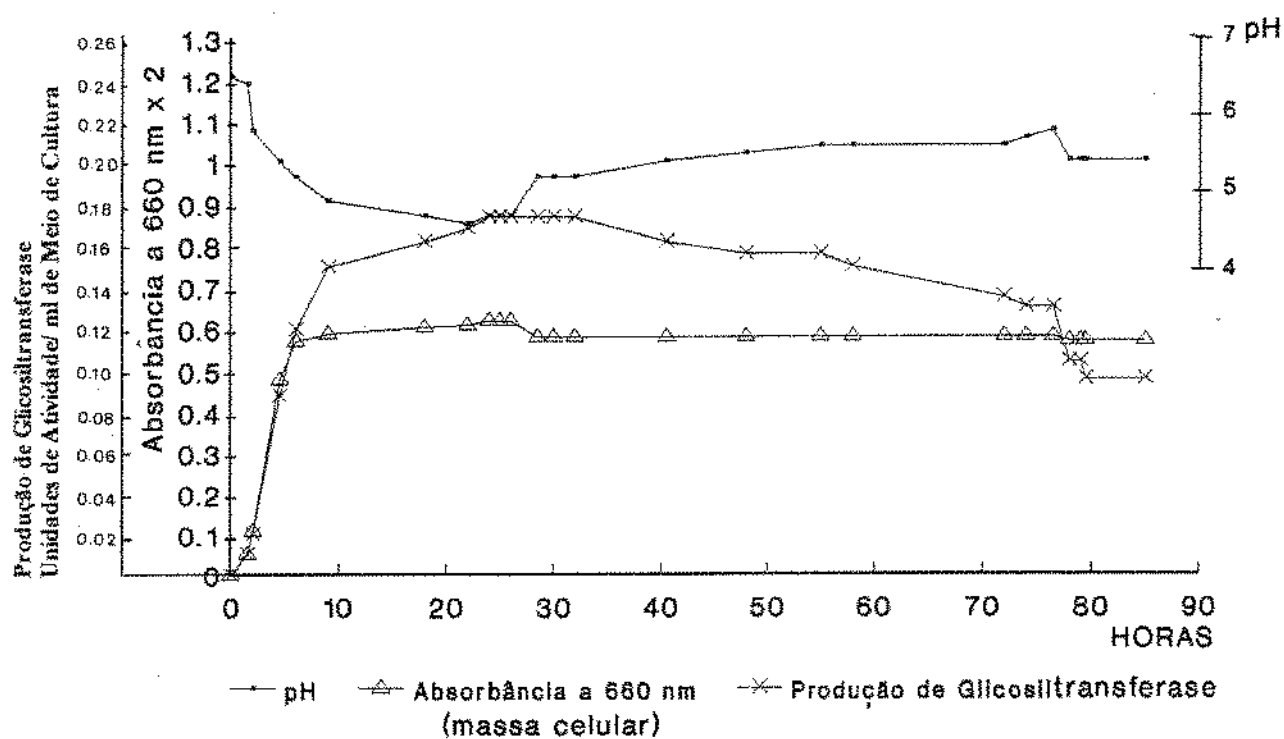


Figura 4 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 36°C

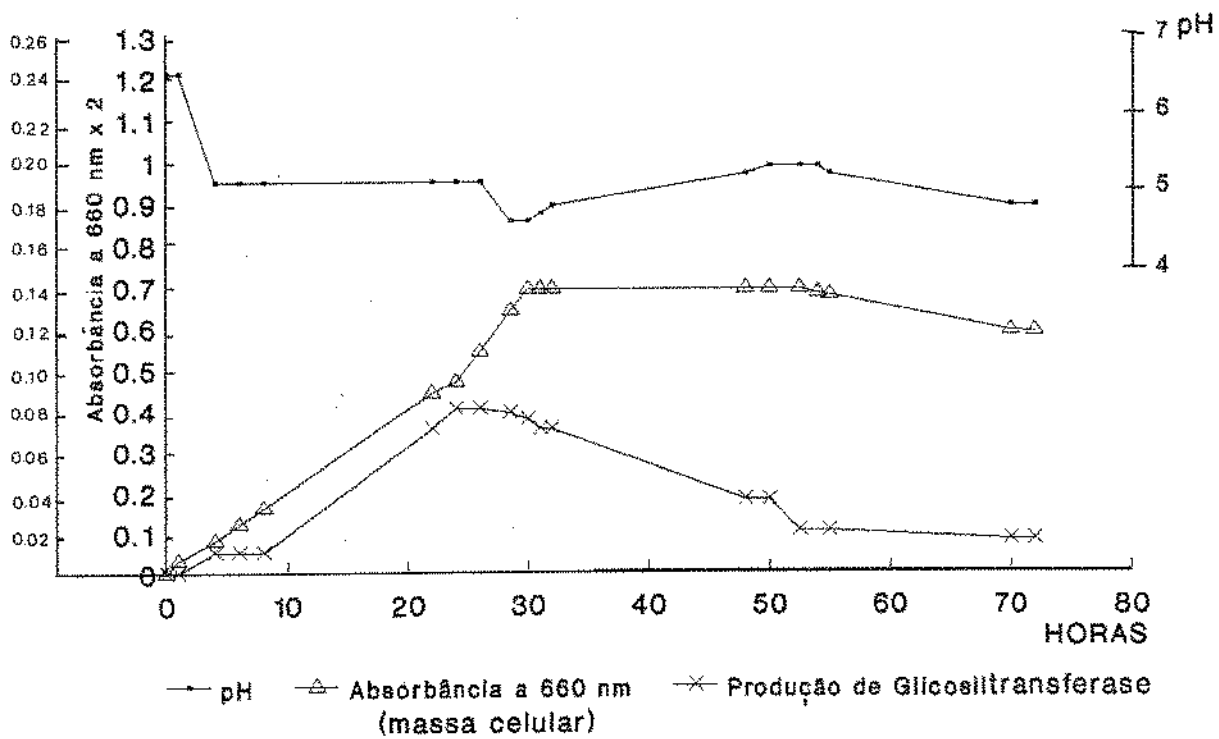


Figura 5 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE DE *Klebsiella sp* N° 18

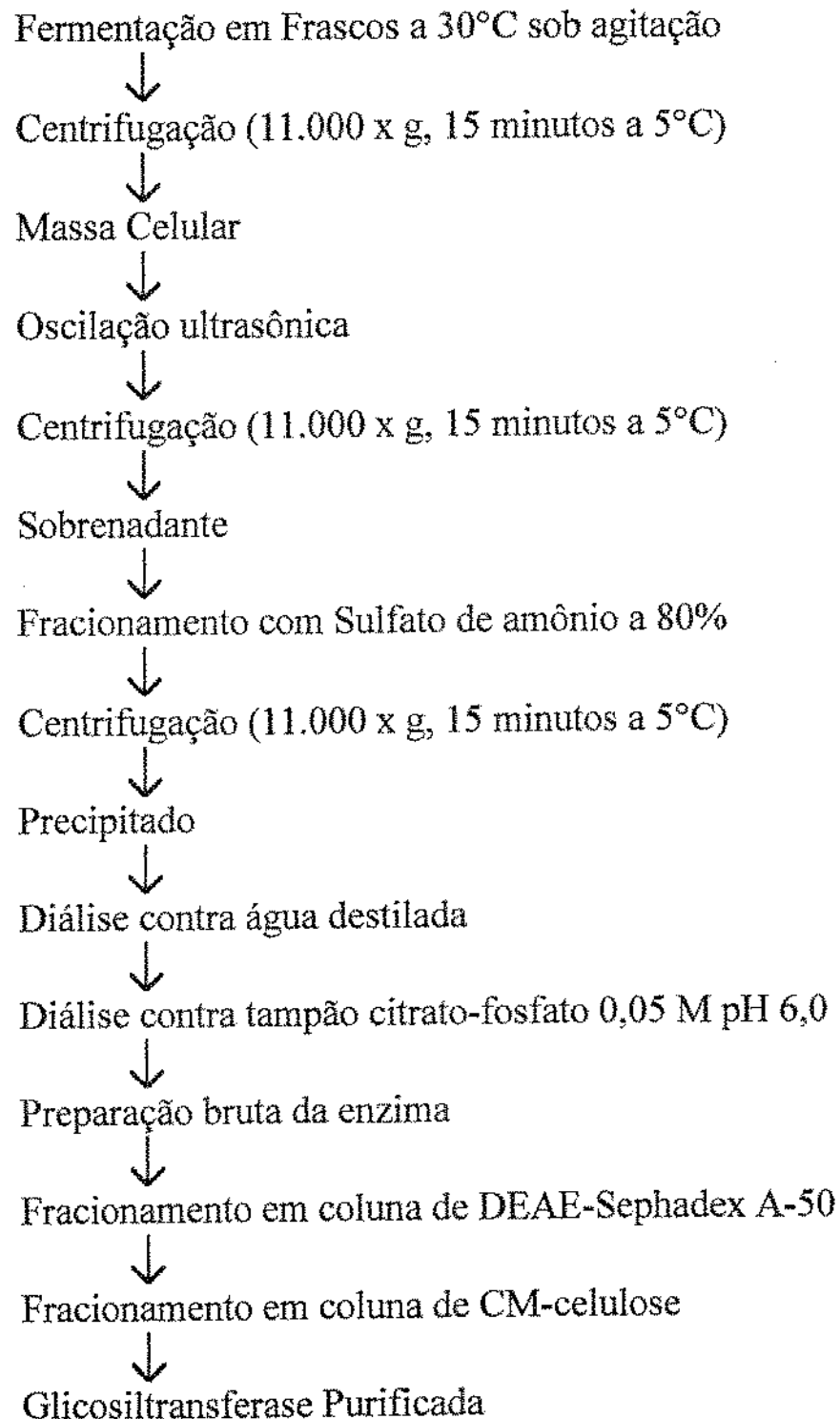


Figura 6 - CROMATOGRAFIA DE GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50

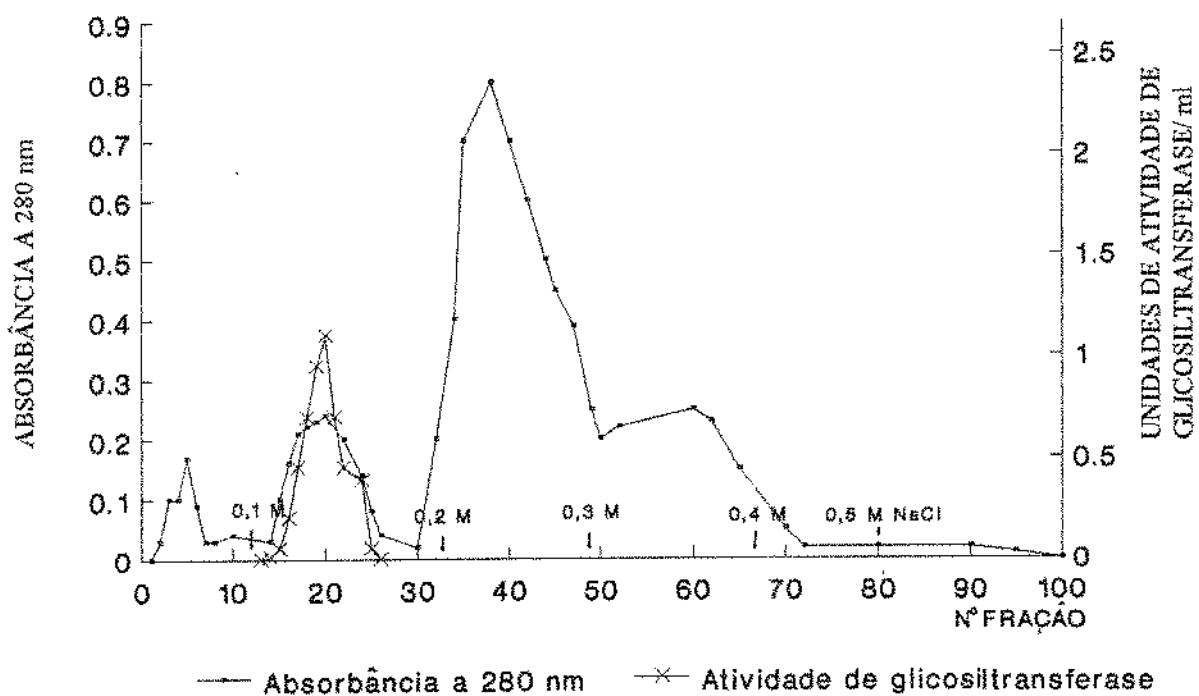


Figura 7 - CROMATOGRAFIA DE GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE CM-CELULOSE

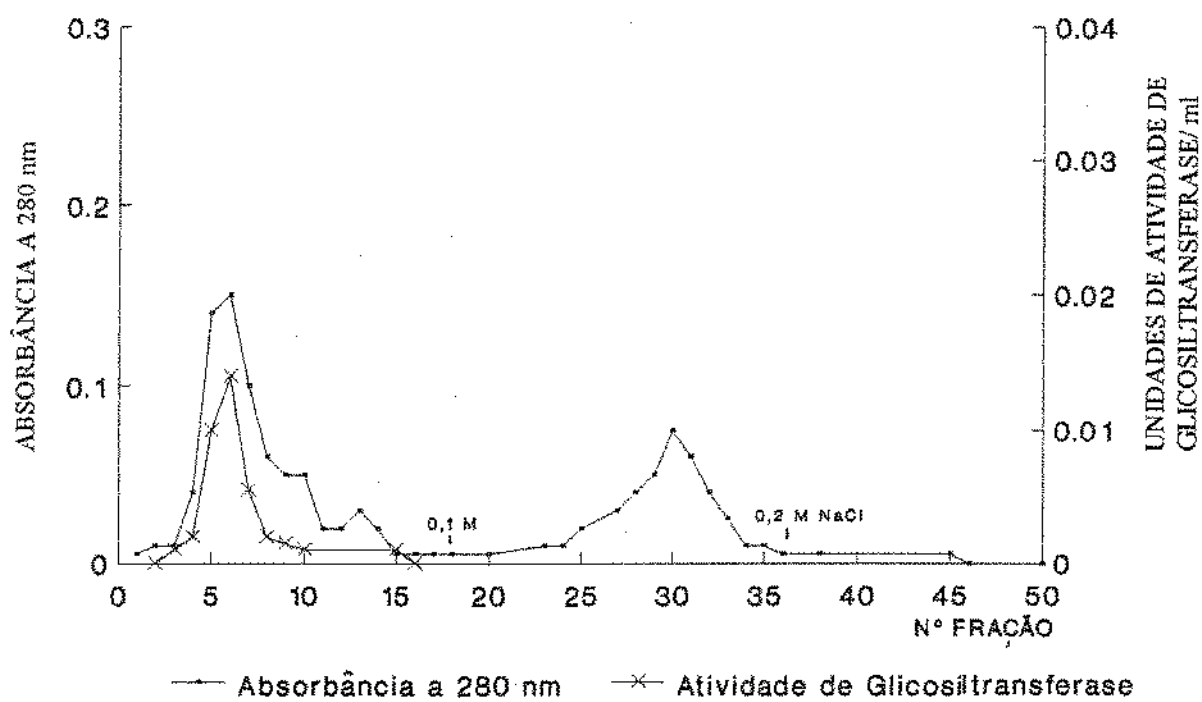


Figura 8 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE

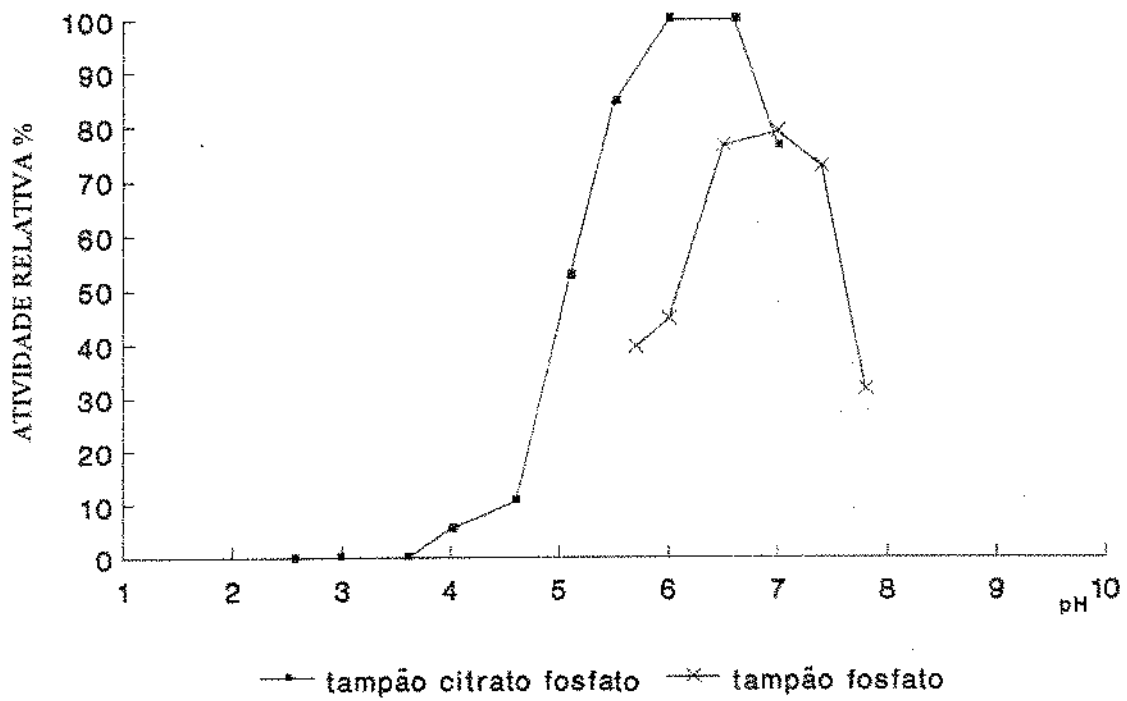


Figura 9 - EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE

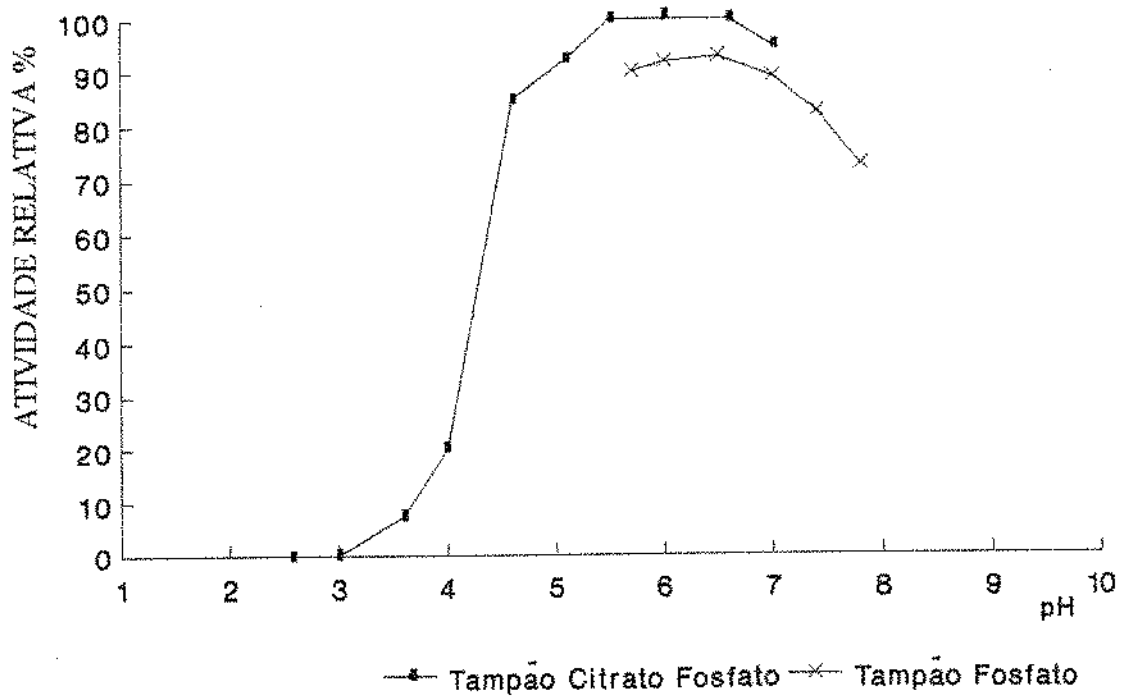


Figura 10 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

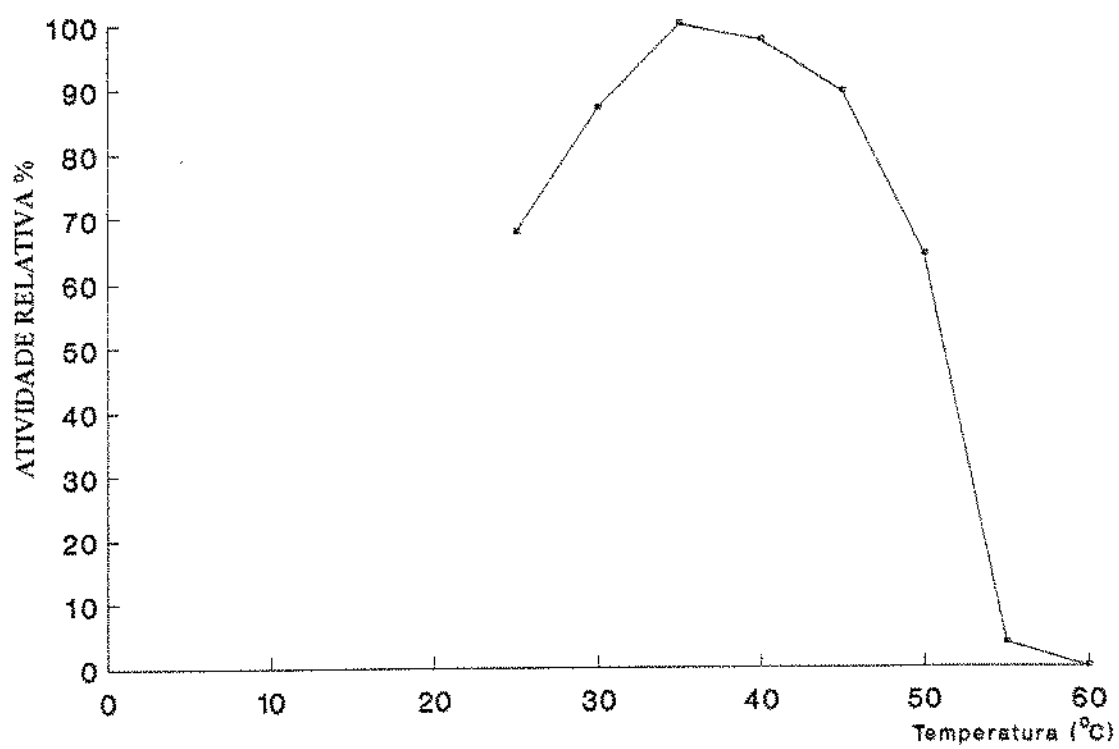


Figura 11 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA GLICOSILTRANSFERASE

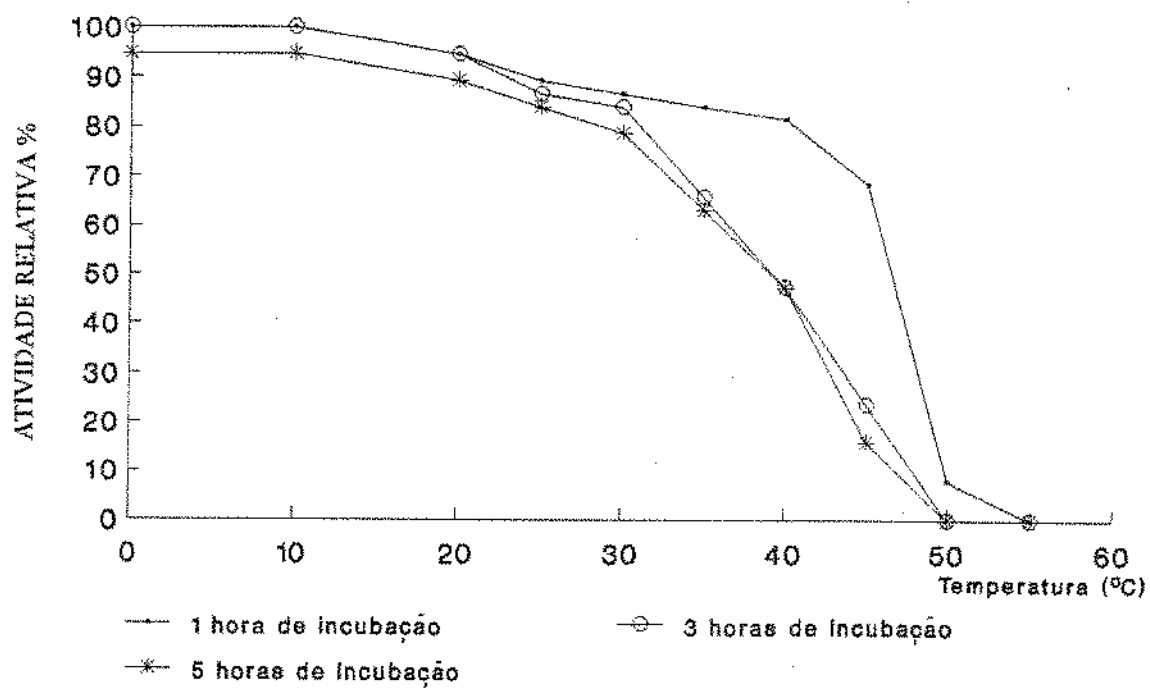


Figura 12 - RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE INCUBAÇÃO E CONVERSÃO DE SACAROSE PARA PALATINOSE A 25°C, 30°C E 35°C

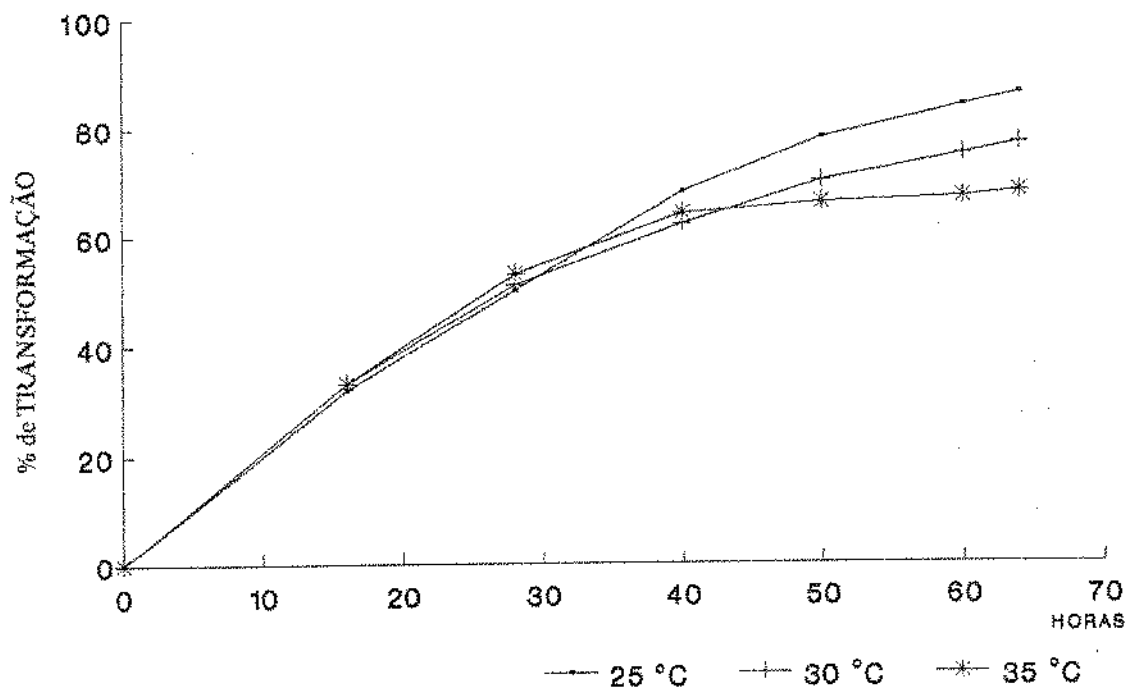


Figura 13 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SACAROSE NA ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE

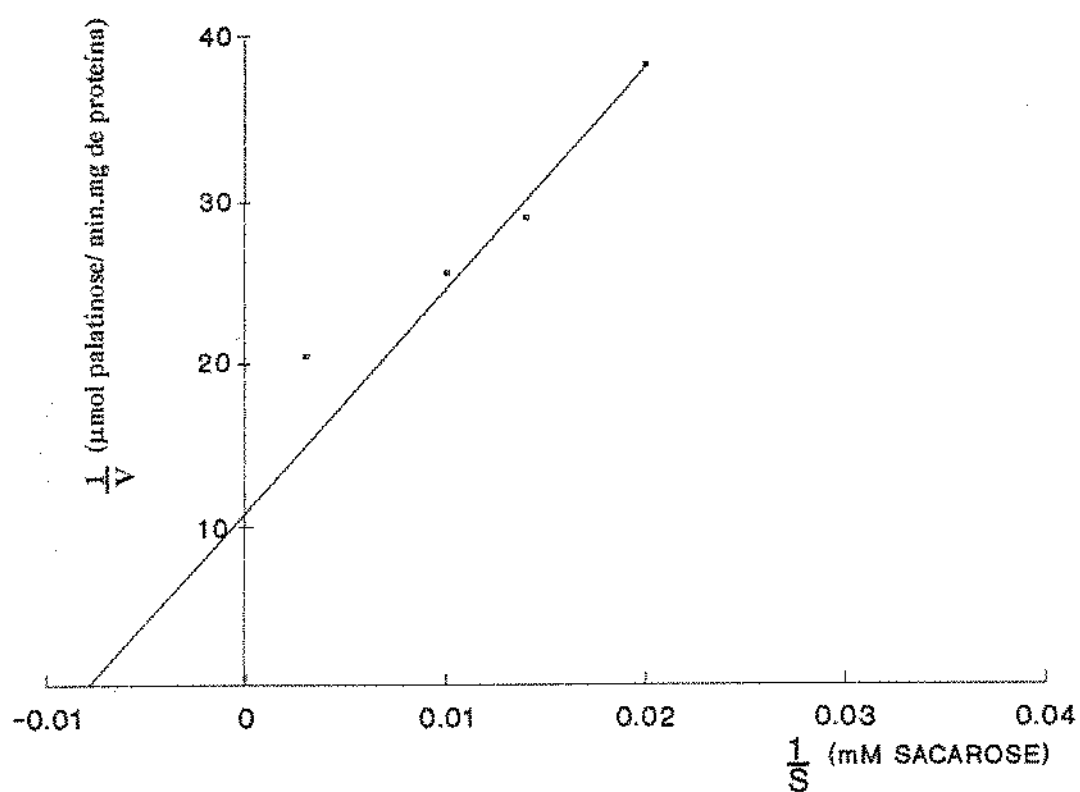
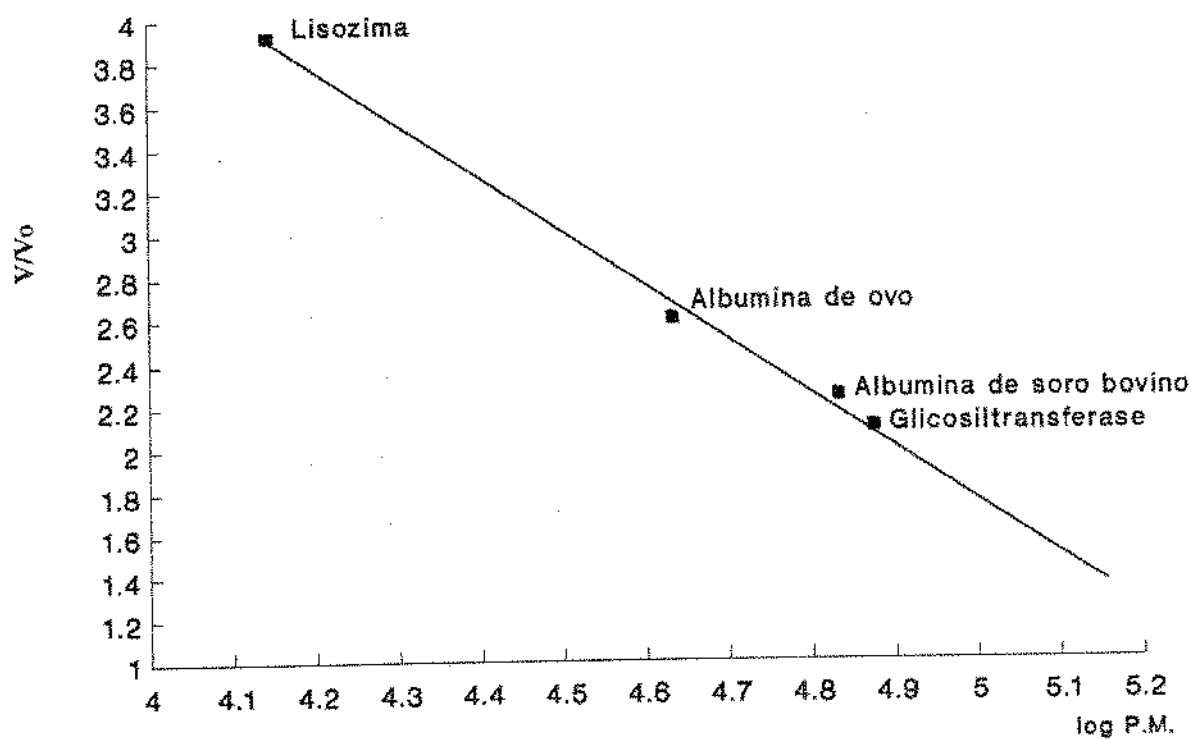


Figura 14 - RELAÇÃO ENTRE VOLUME DE ELUIÇÃO E PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS EM COLUNA DE SEPHADEX G-200



5 -CONCLUSÕES

5.1. - O microrganismo isolado e selecionado como produtor de glicosiltransferase foi identificado como *Klebsiella sp.*

5.2. - A glicosiltransferase de *Klebsiella sp* n° 18 catalisa a conversão de sacarose em palatinose e pode ser classificada como E.C. 2.4.1. __ Hexosiltransferase.

5.3. - A glicosiltransferase intracelular de *Klebsiella sp* n° 18 é produzida na fase exponencial de crescimento. A produção máxima de enzima foi obtida após 24 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne, ajustado para pH 6,5.

5.4. - A glicosiltransferase purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose apresenta atividade ótima em tampão citrato-fosfato na faixa de pH 6,0 a 6,6 e a 35°C. A enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 5,5 a 6,6 em tampão citrato-fosfato. A enzima é termosensível; a incubação da enzima purificada em tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,0 à 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C durante 1 hora, na ausência de substrato, resultaram em 0%, 5,3%, 10,5%, 13,2%, 15,8%, 18,4%, 31,6%, 92,1%, e 100% de inativação respectivamente.

5.5. - A conversão máxima de sacarose em palatinose foi 86% quando a enzima foi incubada com solução contendo 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,5 a 25°C por 64 horas.

5.6. - A atividade da glicosiltransferase não é afetada por CuSO₄, KCl, MgSO₄, FeCl₃ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração 1 mM. Os sais MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂,

BaCl₂ e CoCl₂, inibiram levemente a atividade da enzima enquanto que HgCl₂ e AgNO₃ inibiram totalmente a atividade de glicosiltransferase na concentração 1 mM.

5.7.- A atividade de glicosiltransferase foi inibida pelo reagente iodo na concentração 0,1; 1,0 e 10 mM, sugerindo que resíduos de tirosina podem estar envolvidos na atividade enzimática. Os reagentes p-cloromercuribenzoato e iodoacetamida não inibiram a atividade de glicosiltransferase, sugerindo que a enzima não possui grupamentos sulfidrílicos essenciais para a sua atividade catalítica.

5.8. - Os valores de Km e Vmáx da glicosiltransferase foram respectivamente 120 mM de sacarose e 0,090 µmol de palatinose/ min.mg de proteína.

5.9. - A glicosiltransferase apresenta peso molecular de 74.000 daltons, estimado através de filtração em gel Sephadex G-200.

6 - SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

Otimização das condições de cultivo de *Klebsiella sp* para produção de glicosiltransferase e palatinose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of protein related to their molecular weights over a wide range. **Biochem. J.**, 96:595-605, 1965.
2. AVIGAD, G. Synthesis of glucosylfructoses by the action of a yeast-glucosidase **Biochem. J.**, 73:587-593, 1959.
3. BOLLINGER, H. Future Ingredients - Focus of OVIFT Meeting. **Food Technol.**, January, 61-62, 1988.
4. BOURNE, E. J. ; HUTSON, D. H.; WIGEL, H. Oligosaccharides in dextran-producing cultures of *Streptococcus bovis*. **Biochem. J.**, 79:549-553, 1961.
5. BUCHHOLZ, K. Enzymatischer aufbau von oligo - und polysacchariden aus saccharose. **Zuckerind.** 112 (12): 1059-1062, 1987.
6. CHEETHAM, P.S.J.; IMBER, C.E.; ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsodica*. **Nature**, 299:628-631, 1982.
7. CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotech. Bioeng.**, 27:471-481, 1985.

8. DIXON, M. ; WEBB, E. C. **Enzymes**. Academic Press, London, 3^oEd.: 762-834, 1989.
9. FUJI, S.; KISHIHARA, S.; KOMOTO, M. ; SHIMIZU J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, 30(6):339-344, 1983.
10. GRENBY, T.H. Nutritive sucrose substitutes and dental health. In: **Developments in Sweeteners-2**. Eds. T.H. Grenby, K.J. Parker & M.G. Lindley. Applied Science Publishers Ltd. London, 51-89, 1983.
11. IRWIN, W. E. Isomalt - A sweet, reduced-calorie bulking agent. **Food Technol.**, June, 128, 1990.
12. KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. **Biochim. Biophys. Acta**, 614:46-62, 1980.
13. KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Willians & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 1^o Ed. 1:408-465, 1984.
14. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.** 56:658-666, 1934.
15. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A.L.F.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193:265-275, 1951.

16. LUND, B. M.; WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **J. Gen. Microbiol.**, 78:331-336, 1973.

17. MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2° Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 1980.

18. MALLETTE, M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: **Methods in Microbiology**. Vol. 1 Eds. J. R. Norris & D.W. Ribbons. Academic Press, London, 522-566, 1969.

19. MAUCH, V. W.; SCHMIDT-BERG-LORENZ, S. (citado por MCALLISTER et alii, 1990) **Zeitung fur die Zuckerind.**, 11:310-326, 1964 a.

20. MAUCH, V. W.; SCHMIDT-BERG-LORENZ, S. (citado por MCALLISTER et alii, 1990) **Zeitung fur die Zuckerind.**, 13:375-410, 1964 b.

21. MCALLISTER, M.; KELLY, C.T.; DOYLE, E.; FOGARTY, W.M. The isomaltulose synthesising enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnol. Lett.**, 12(9): 667-672, 1990.

22. MCDONALD, I.; DANIEL, J. W. (citado por STRATER, 1987) The bio-availability of isomaltulose in man and rat. **Nutrition Reports International**, 28:1083-1090, 1983.

23. NISIZAWA, K.; HASHIMOTO, Y. Glycoside hydrolases and glycosyl transferases. In: **The Carbohydrates-Chemistry and Biochemistry - II** A. Pigman Horton, 241-299, 1970.

24. PARTRIDGE, S. M. Filter-paper partition chromatography of sugars. **Biochem. J.**, 42: 238-247, 1948.
25. ROBERTS, P. G.; HAYES, M.L. (citado por MCALLISTER et alii, 1990) **Scand. J. Dent. Res.** 24: 201-209, 1980.
26. SCHWIMMER, S.; BEVENUE, A. Reagent for differentiation of 1,4 - and 1,6- linked glucosaccharides. **Science**, 123:543-544, 1956.
27. SHARPE, E. S.; STODOLA, F. H.; KOEPESELL, H.J. **Abstracts of Papers**, 126th Meeting American Chemical Society, New York, September, p. 5-D, 1954 (citado por SHARPE et alii, 1960).
28. SHARPE, E. S.; STODOLA, F. H.; KOEPESELL, H. J. Formation of isomaltulose in enzymatic dextran synthesis. **J. Org. Chem.**, 25:1062-1063, 1960.
29. SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. (citado por FUJI et alii, 1983) **Japan Patent**, 57-39794, 1982.
30. SIDDIQUI, I. R.; FURGALA, B. Isolation and characterization do oligosaccharide from honey. Part I - Disaccharides. **J. Apicultural Research**, 6: 139-145, 1967.
31. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.** 160: 61-68, 1945.

32. STODOLA, F. H.; KOEPESELL, H. J.; SHARPE, E. S. Ein neues von *Leuconostoc mesenteroides* gebildetes Disaccharid. **J. Amer. Chem. Soc.**, 74:3202-3203, 1952 (Abstr. aus Chem. Zbl., 1953, 4376).
33. STODOLA, F. H.; SHARPE, E. S.; KOEPESELL, H. J. The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. **J. Amer. Chem. Soc.** 78:2514-2518, 1956.
34. STRATER, P. J. Palatinose. **Zuckerind.** 112(10): 900-902, 1987.
35. TOPITSOGLOU, V.; SASAKI, N.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (Palatinose) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Res.**, 18:14-51, 1984.
36. WALLENFELS, K.; BENDER, H.; RACHED, J. R. Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*: Production in a cell-bound state. Purification and Properties of the Enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 22(3): 254-266, 1966.
37. WEIDENHAGEN, R.; LORENZ, S. (citado por SHARPE et alii, 1960) Palatinose (6- α -glucopyranosyl-fructofuranose), ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt der Saccharose. **Z. Zuckerind.** 7:533-534, 1957.