

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**UTILIZAÇÃO DO YACON (*Smallanthus sonchifolia*) PARA ESTUDO DE
SEUS AÇÚCARES E COMO FONTE DE INVERTASE. PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE INVERTASE EXTRAÍDA DO YACON.**

Luciana Maria Liboni Passos

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Luciana Maria Liboni Passos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de Setembro de 2002.

Campinas, 06 de Setembro de 2002


Prof. Dr. Yong Kun Park
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas
São Paulo – Brasil
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P268u
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51097
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28/09/02
Nº CPD _____

CM00174448-6

BIB ID 259943

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

P268u Passos, Luciana Maria Liboni
Utilização do yacon (*Smallanthus sonchifolia*) para estudo de
seus açúcares e como fonte de invertase. Purificação e
caracterização de invertase extraída do yacon / Luciana Maria
Liboni Passos. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Yong Kun Park
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Invertase. 2. Carboidratos. I. Park, Yong Kun.
2. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)



Prof. Dr. Hélia Harumi Sato
(membro)



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(membro)

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
(membro)



Prof. Dr. José Luiz Contado
(membro)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(membro)



Profa. Dra. Helena Teixeira de Gogoy
(membro)

Campinas, de agosto de 2002

Ao meu marido, Dado, e minha filha, Ana.
Aos meus pais, Ayrton e Tereza Inez,
Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida.

Aos meus pais Ayrton e Tereza Inez, por terem me ensinado a viver.

Ao meu marido Dado pelo amor e incentivo incondicionais.

À minha filha Ana por ser minha maior fonte de alegria e inspiração.

Aos amigos Severino, Margarida, Mareci, Biba e Cláudio pelo companheirismo e solidariedade, que tornaram mais amena a conclusão deste trabalho.

Aos amigos Fabiana, Masaharu, Luciana Ferracini, Berenice, Neiva, Julio, Alice, Giselle, Ana Maria, Wilma, pelo carinho e presença agradáveis.

Aos funcionários Bia, Marcelo Funo e Dora pela colaboração e amizade.

Ao prof. Park, pela oportunidade de trabalhar nesta Instituição.

Aos membros da banca examinadora, os professores Hélia, Hilary, Contado, Severino, Gláucia e Helena, pela colaboração nesta etapa final do trabalho.

Às professoras Adilma, Lúcia Durrant e Gláucia pelo auxílio com equipamentos e infra estrutura.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À todos que de alguma forma participaram deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
INTRODUÇÃO	1
<u>CAPÍTULO 1: YACON (<i>SMALLANTHUS SONCHIFOLIA</i>) COMO FONTE DE AÇÚCARES E ENZIMAS. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
Referências Bibliográficas	7
<u>CAPÍTULO 2: FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: IMPLICAÇÕES NA SAÚDE HUMANA E SUA UTILIZAÇÃO. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	11
Frutooligossacarídeos: Conceitos e produção	11
FOS e seus efeitos benéficos à saúde	13
Características e aplicações dos FOS	16
Referências Bibliográficas	18
<u>CAPÍTULO 3: INVERTASES E SUAS FUNÇÕES NO METABOLISMO DE PLANTAS SUPERIORES. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	25
Introdução	25
Definição e modo de ação	25
Metabolismo em plantas superiores	27
Utilização das invertases	34
Referências Bibliográficas	37
<u>CAPÍTULO 4: COMPORTAMENTO PÓS COLHEITA DE RAÍZES DE YACON (<i>SMALLANTHUS SONCHIFOLIA</i>) COM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE INVERTASES</u>	43
Resumo	43
Summary	43
Introdução	44
Material e Métodos	45
Resultados e discussão	47

Conclusões	54
Referências Bibliográficas	55
<u>CAPÍTULO 5: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE YACON (<i>SMALLANTHUS SONCHIFOLIA</i>)</u>	59
Resumo	59
Summary	59
Introdução	59
Material e métodos	60
Resultados	63
Discussão	67
Conclusões	69
Referências Bibliográficas	70
<u>CAPÍTULO 6: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INVERTASE DE YACON (<i>SMALLANTHUS SONCHIFOLIA</i>).</u>	73
Resumo	73
Summary	73
Introdução	73
Material e Métodos	75
Resultados e Discussão	79
Conclusões	91
Referências Bibliográficas	92
CONCLUSÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos : 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C). 11
- Figura 4.1:** Atividade enzimática do extrato de yacon e produtos de reação (frutose e glicose) após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento a temperatura ambiente. 47
- Figura 4.2:** Atividade enzimática do extrato de yacon e produtos de reação (frutose e glicose) após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento em geladeira. 48
- Figura 4.3:** Mudanças na quantidade dos açúcares frutose, glicose, sacarose, 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e neokestose (GF₄) durante o armazenamento de yacon a temperatura ambiente após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias. 49
- Figura 4.4:** Mudanças na quantidade dos açúcares frutose, glicose, sacarose, 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e neokestose (GF₄) durante o armazenamento de yacon em geladeira após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias. 50
- Figura 5.1:** Comparação da recuperação de β-frutofuranosidade do extrato enzimático de yacon (EEY) usando sulfato de amônio e solventes orgânico. 63
- Figura 5.2:** Obtenção de β-frutofuranosidade do EEY usando diferentes concentrações de sulfato de amônio. 64
- FIGURA 5.3:** Efeito do pH na atividade enzimática do EEY, com substrato sacarose 10%, incubação por 2 h a 40°C. 64
- FIGURA 5.4:** Efeito da temperatura na atividade enzimática do EEY, com substrato sacarose 10%, incubação por 2 h, em pH 5,5. 65
- Figura 5.5:** pH de estabilidade do EEY após incubação da enzima por 24 horas, seguida de medição da atividade a pH 5,5, a 40° C por 2 horas. 65

Figura 5.6: Temperatura de estabilidade do EEY após incubação por 2 horas a pH 5,5, seguida de medição da atividade a pH 5,5, a 40° C por 2 horas.	66
FIGURA 5.7: Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática do EEY, com incubação por 2 h a 40°C (M-M).	66
Figura 5.8: Determinação gráfica dos valores de Km e Vmáx da invertase de yacon de acordo com Lineweaver-Burk. A regressão linear da curva é $y = 0,2042x + 7,9067$, com $r^2 = 0,9168$. Isto corresponde a um Km = 0,0258M e Vmáx = 0,1265μmol/mL/min.	67
Figura 6.1: Perfil cromatográfico da purificação da invertase de yacon em coluna aberta de Sephadex G-200. □ representa a atividade enzimática e ♦ representa proteínas.	80
Figura 6.2: SDS-PAGE. (1): marcadores de PM em KDa. (2): amostra após resina G200. (3) e (4): amostra após resina Q-Sepharose.	81
Figura 6.3: Curva padrão para determinação de peso molecular em coluna de gel Sephacryl S-200.	82
Figura 6.4: Perfil cromatográfico da invertase de yacon 280nm e a 220 nm.	83
Figura 6.5: pH ótimo de atuação da invertase de yacon.	84
Figura 6.6: Temperatura ótima de atuação da invertase ácida de yacon.	85
Figura 6.7: pH de estabilidade da invertase de yacon a 40° C.	86
Figura 6.8: Temperatura de estabilidade da invertase de yacon a pH 5,5.	86
Figura 6.9: Efeito da concentração de sacarose na atividade da invertase a 60° C, pH 5,5 por 2 horas.	87
Figura 6.10: Detrminação gráfica dos valores de Km e Vmáx da invertase semi purificada de yacon, de acordo com Lineweaver-Burk. Os cálculos com a equação da reta levam a Vmáx = 0,0134 μmol/ml/min e Km = 0,1812 M.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1. Purificação parcial de invertase de yacon.	79
Tabela 6.2: Efeito de diferentes íons metálicos e inibidores na atividade da invertase de yacon.	89

RESUMO

O yacon é uma raiz andina, rica em frutooligossacarídeos, e de fácil cultivo. Além da presença de grande quantidade de açúcares, há evidências da presença de enzimas do tipo β -frutofuranosidases, como invertases, em seu metabolismo.

Raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolia*) foram colhidas e armazenadas em diferentes condições. Foram acompanhados o conteúdo de carboidratos e a atividade enzimática de invertases destas raízes. Em termos de carboidratos as maiores mudanças observadas, nas raízes de yacon, foram no conteúdo de frutose e 1-kestose. A atividade enzimática variou bastante durante os diferentes armazenamentos, sendo a atividade máxima de invertase obtida após 15 dias de armazenamento a 4°C. As concentrações dos açúcares variaram bastante, sendo que os açúcares que se encontraram em maiores concentrações foram frutose e 1-kestose. As concentrações dos açúcares como um todo aumentaram durante os diferentes armazenamentos.

Enzimas do tipo β -frutofuranosidase foram extraídas de yacon. A otimização da extração foi realizada utilizando diferentes tampões, com diferentes valores de pH, e com diferentes tipos de fracionamento de proteínas. O extrato enzimático de yacon apresentou invertase com pH ótimo igual a 5,5 e temperatura ótima igual a 40° C, e valores K_m e $V_{m\acute{a}x}$, para substrato sacarose, iguais a 0,0258M e 0,1265 $\mu\text{mol/mL/mim}$, respectivamente. O extrato apresentou atividade de invertase detectada por açúcares redutores resultantes da reação enzimática. As enzimas apresentaram estabilidade a valores de pH entre 5,0 e 5,5, e estabilidade à temperatura entre 25° C e 40° C.

As invertases de yacon extraídas foram semipurificadas e caracterizadas. O perfil cromatográfico e SDS-PAGE indicaram a presença de isoformas na fração final da purificação enzimática, bem como o seu comportamento com relação a temperatura e pH. O pH ótimo de atuação da invertase semipurificada foi de 5,5, e a temperatura ótima de atuação foi a 60° C. O peso molecular da invertase foi estimado em 68 KDa por eletroforese SDS-PAGE e filtração em gel Sephacril S-

200. A enzima apresentou baixa estabilidade ao pH, e estabilidade a temperatura somente entre 35° C e 40° C.

SUMMARY

Yacon is an Andean root, rich in fructooligosaccharides, and easy to grow. It contains great amount of sugars, and evidence of the presence of enzymes of the β -fructofuranosidase type, such as invertases, in its metabolism.

Yacon (*Smallanthus sonchifolia*) roots were harvested and stored under different conditions. The sugar contents and invertase activity of these roots were followed. The greatest changes in the sugar contents occurred with fructose and 1-kestose. The enzymatic activity varied with the different storage conditions, and the maximum activity was after 15 days storage at 4°C. The sugar concentrations varied a lot, and the highest sugar concentrations were found for fructose and 1-kestose. All the sugar concentrations increased during the different storage conditions and times.

Enzymes of the type β -fructofuranosidase were extracted from yacon. The extraction optimization was accomplished using different buffers, different pH values and different types of protein precipitation. The enzymatic extract was biochemically characterized, showing an optimum pH of 5.5, optimum temperature of 40° C and the following kinetic parameters: $K_m = 0.0258$ and $V_{max} = 0.1265$. The extract presented invertase activity, detected by the production of reducing sugars from the enzyme reaction. The enzymes showed pH stability between 5,0 and 5,5, and temperature stability between 25° C and 40° C.

The yacon invertases were semipurified and characterized. The chromatographic profile and SDS-PAGE indicated the presence of isoforms in the final fraction of the purification, as well as its behavior with respect to temperature and pH. The optimum pH of the semipurified invertase was 5.5 and the optimum temperature was 60° C. The molecular weight of the invertase was 68 Kda, determined by eletroforese SDS/PAGE and gel filtration in Sephacril S-200. The enzyme presented low stability to pH, and temperature stability only between 30° C and 40° C.

INTRODUÇÃO

O yacon é um tubérculo andino, fonte potencial de frutooligossacarídeos (ZARDINI, 1991). Era originalmente classificado como *Polymnia* (Compositae, Heliantheae), mas estudos mais recentes de ROBINSON (1978, citado por GRAU e REA, 1997) restabeleceram-no como sendo do gênero *Smallanthus*. Uma espécie da América do Norte, a maioria das espécies da América Central e todas as espécies da América do Sul foram classificadas como *Smallanthus*, enquanto que a maioria das espécies da América do Norte continuam classificadas como *Polymnia*. Portanto, o yacon é um *Smallanthus sonchifolia*.

O yacon é um parente distante do girassol, mas o seu cultivo não é feito através de sementes, mas de raízes comestíveis (KURODA e ISHIRARA, 1995). O interesse comercial por esta planta começou a partir dos anos 70, quando foi levada dos Andes para a Nova Zelândia, e de lá para o Japão e a Coreia. Mais tarde, nos anos 90, iniciou-se o cultivo do yacon no Brasil, especificamente no Estado de São Paulo (GRAU e REA, 1997).

São atribuídos muitos efeitos benéficos destas plantas ao ser humano, principalmente pelo seu alto conteúdo de oligofrutas (frutooligossacarídeos). Estes açúcares não são digeridos pelo trato gastrointestinal superior, estimulando o crescimento de bifidobactérias intestinais, evitando a elevação do nível de glicose no sangue e/ou estimulando a secreção da insulina (NINESS, 1999).

A sacarose está presente no yacon em forma transportável ou livre, como na maioria das plantas superiores. Ela é clivada tanto por invertases quanto por sacarose sintases (GUPTA et al., 1991). O metabolismo das plantas superiores em si implica na existência de pelo menos duas diferentes invertases em seus tecidos (CHENG et al., 1990). A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose em ligação β -2,1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosidases presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992).

A composição dos carboidratos de plantas que armazenam frutanas varia bastante de acordo com tipo de solo e clima onde foram cultivados, tempo de colheita, tempo e temperatura de armazenamento, entre outros fatores. Este trabalho teve como objetivo estudar mudanças no conteúdo de diferentes açúcares do yacon durante armazenamento em diferentes condições. Visou também relacionar as variações destes açúcares com enzimas do tipo invertase, além de purificar e caracterizar este tipo de enzima.

CAPÍTULO 1: YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*) COMO FONTE DE AÇÚCARES E ENZIMAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente as espécies tuberosas constituem, depois dos cereais, as principais fontes de alimentos da humanidade. A batata e a mandioca estão entre estas espécies. O yacon compartilha com estas espécies de uma estratégia de sobrevivência subterrânea. Mas há muitas diferenças entre o yacon e a batata e a mandioca, principalmente no tipo de substância que armazenam.

Enquanto que nos Andes há uma perda gradativa da área de cultivo de yacon, tem havido um processo inverso fora de lá. A Nova Zelândia começou este processo nos anos 70. Em 1985 o cultivo foi levado da Nova Zelândia para o Japão, e depois para a Coreia. No Japão se desenvolveu uma pequena indústria agrícola com o yacon, visando principalmente suas propriedades dietéticas e medicinais. No começo dos anos 90 um agricultor brasileiro de origem japonesa introduziu a espécie na cidade de São Paulo. Aqui há produção não só das raízes frescas, como também raízes desidratadas (chips) e folhas secas para o preparo de chá. A alta produtividade e rusticidade do yacon têm levado alguns cientistas a pleiteá-lo como fonte de matéria prima para xarope de frutose (GRAU e REA, 1997).

O yacon era originalmente classificado como *Polymnia* (Compositae, Heliantheae), mas estudos mais recentes de ROBINSON (1978, citado por GRAU e REA, 1997) restabeleceram o gênero *Smallanthus*. Uma espécie da América do Norte, a maioria das espécies da América Central e todas as espécies da América do Sul foram classificadas como *Smallanthus*, enquanto que a maioria das espécies da América do Norte continuam classificadas como *Polymnia*.

Yacon é uma planta nativa dos Andes que possui grandes raízes tuberosas, com elevada quantidade de oligofrutas (ZARDINI, 1991). O yacon é um parente distante do girassol, mas o seu cultivo não é feito através de sementes, mas de

raízes comestíveis (KURODA e ISHIRARA, 1995). Cresce em tubérculos grandes, suculentos, com raízes que são reservatórios naturais de inulina, em florestas nebulosas desde a encosta leste dos Andes da Venezuela até o nordeste da Argentina, a cerca de 2.000m de altitude. A planta cresce rápido e facilmente, atingindo a maturidade em 6 ou 7 meses, e sobrevive até mesmo em solos pobres. Atinge entre 1,5 e 3 metros de altura, e o sistema radicular é composto por 4-20 raízes tuberosas, que podem chegar ao diâmetro de 10-25cm. O yacon produz dois tipos de porções subterrâneas comestíveis - o caule rizomáceo (usado pela planta para reprodução vegetativa) e o caule tuberoso (usado pela planta como reserva nutricional). As raízes intumescidas são preferidas para comer por serem mais doces, suculentas e menos fibrosas. Os caules, apesar de suculentos quando jovens, são um pouco ásperos quando maduros (VIETMEYER, 1989, e GRAU e REA, 1997).

Entre as plantas andinas, esta é atualmente a mais promissora a atrair a atenção mundial num futuro próximo devido a sua surpreendente variedade de vantagens e benefícios. Assim como outras espécies do gênero, suas raízes sintetizam inulina ou componentes relacionadas a inulina (ZARDINI, 1991). O corpo humano não possui enzimas que hidrolisam estes açúcares, portanto eles passam através do trato digestivo sem ser metabolizados, o que significa que o yacon fornece poucas calorias (VIETMEYER, 1989, e NINESS, 1999). Portanto, é um alimento promissor para dietas e diabéticos, e pode ser mais produtivo que outros já conhecidos reservatórios de inulina (chicória e alcachofra, por exemplo), uma vez que tanto as raízes como os rizomas da planta são reservatórios deste carboidrato, ao contrário das outras, onde apenas uma das partes das plantas funciona como tal (ZARDINI, 1991). Como a inulina e oligofrutoses não são digeridos pelo trato gastrointestinal superior, elas estimulam o crescimento de bifidobactérias intestinais, não elevam o nível de glicose no sangue ou estimulam a secreção da insulina. Avaliações comerciais de produtos que usam a inulina atribuíram a ela um flavor neutro e suave, um aumento de palatabilidade, estabilidade e aceitabilidade de produtos de baixa caloria (NINESS, 1999). Além disso, o yacon pode ser uma proveitosa fonte para adoçantes com alta

concentração de frutose, bem como de snacks vegetais frescos (VIETMEYER, 1989).

Vários açúcares são armazenados nas raízes de yacon: glicose, frutose, sacarose e oligossacarídeos de baixo grau de polimerização. A inulina, uma oligofrutana de alto grau de polimerização (DP), é o maior composto de armazenamento da maioria das plantas da família das Compositae, como *Helianthus tuberosus*, e *Dahlia*. No entanto, no yacon este é um componente que aparece somente em traços, ao contrário dos oligossacarídeos de baixo DP, que podem chegar a 67% dos açúcares de yacon em peso seco (GRAU e REA, 1997).

O yacon é rico em proteína bruta, K_2O e P_2O_5 , e forma dois tipos de bulbos: rizomas e raízes. Pesa entre 200 e 500g, podendo chegar a 2 kg. Sua composição é similar à da alcachofra (HOLA e MICHL, 1996). Seu valor nutricional é baixo, e consiste basicamente de carboidratos. As raízes frescas possuem de 69 a 83% de umidade, 0,4 a 2,2% de proteínas e 20% de açúcares (VIETMEYER, 1989). Os bulbos das raízes contêm, em termos de porcentagem (%): cinzas 3,59; proteína 6,02; gordura 1,32; fibra bruta 3,88; nitrogênio livre extraível 85,19; K_2O 1,76; CaO 0,18; MgO 0,13; P_2O_5 0,31. Também contém inulina, altas concentrações de mono e dissacarídeos (cerca de 35% de frutose e 58% de glicose + sacarose), e polissacarídeos com baixo grau de polimerização (HOLA e MICHL, 1996). Estudos realizados por KURODA e ISHIRARA (1995) visando selecionar plantas com alta concentração de açúcares totais, conseguiram selecionar plantas de yacon com concentrações acima de 72%. Uma série de oligossacarídeos além de glicose e frutose foi detectada em yacon, mas não em alcachofra. O efeito de armazenamento nos oligossacarídeos do yacon mostrou que as concentrações de glicose e frutose aumentaram, enquanto a dos demais oligossacarídeos diminuíram. Inulooligosacarídeos não foram detectados em yacon nem em alcachofra (WEI et al., 1992). Dentre os vegetais que possuem os maiores níveis de aminoácidos livres se encontra o suco de yacon, junto com os sucos de outros vegetais e frutas como batata, pêra, cebola, tomate, cenoura, e outros (KAPULER e GURUSIDDIAH, 1994). Resultados de análises de carboidratos sugerem que os oligossacarídeos do yacon possuem ligação β - 1,2-D-frutofuranosil, repetindo

unidades com terminal sacarose e, portanto, são oligossacarídeos tipo inulina (GOTO et al., 1995). Estudos realizados em alcachofras, em experimentos conduzidos por dois anos, mostraram que a concentração de carboidratos do tipo frutanas é bastante constante nestes vegetais (durante o período testado), apesar das grandes variações de crescimento dos tubérculos e seus componentes (isto é, número de tubérculos por planta, comprimento dos tubérculos). No entanto, um estímulo na expansão das células e no diâmetro dos tubérculos aumenta a concentração de frutanas (SCHUBERT e FEUEREE, 1997). Os níveis de sacarose e frutose em raízes de chicória permanecem os mesmos durante a época de crescimento, enquanto os níveis de carboidratos totais não estruturais e de frutanas aumentam. Em épocas em que a temperatura cai, e especialmente durante a fase de armazenamento, há aumento de sacarose e frutose; ao mesmo tempo, frutanas que não possuem glicose e com baixo grau de polimerização, e carboidratos totais não estruturais diminuem (ERNEST et al., 1995). Alcachofra e chicória, assim como o yacon, são vegetais que reservam frutanas, principalmente inulina.

A sacarose está presente no yacon em forma transportável ou livre, como na maioria das plantas superiores. Ela é clivada tanto por invertases quanto por sacarose sintases (GUPTA et al., 1991).

O metabolismo das plantas superiores em si implica na existência de pelo menos duas diferentes invertases em seus tecidos (CHENG et al., 1990). Invertases (β -D-frutofuranosídeses) têm um papel chave no metabolismo de sacarose destas plantas. A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose em ligação β -2,1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosídeses presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992). No citosol das plantas superiores a sacarose pode ser hidrolisada por uma invertase neutra ou uma sacarose sintase, gerando hexoses fosfato como substrato para a respiração, para síntese de polissacarídeos estruturais e possível formação de amido. Por outro lado, a sacarose pode ser transportada para o vacúolo, onde é armazenada como tal ou polimerizada em frutanas, como inulina em Asteraceae (por exemplo,

espécies de *Cichorium*, *Helianthus*, *Taraxacum*, *Dalhia*), ou em cadeias mais complexas de frutanas, como ocorre em outros gêneros de plantas. Desta maneira, as invertases de plantas podem preencher papéis fundamentais em todo o metabolismo de açúcares, transporte e armazenamento, pela regulação da concentração de sacarose em locais específicos (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995). A função fisiológica das diversas invertases é difícil de compreender totalmente, mas é possível que várias isoenzimas de invertase sejam ativas em diferentes microambientes, que variem em grau de acidez (GUPTA et al., 1991).

Referências Bibliográficas

- CHENG, J. F.; MITSUYA, N.; JUANG, R. H.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of invertase isosymes from bamboo shoots. Taipei, Tailândia, **Biochemistry International**, v. 21, n. 3, p. 497 - 506, 1990.
- ERNEST, M.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A. Carbohydrate changes in chicory (*Cichorium intybus* L var Foliosum) during growth and storage. Surrey, Inglaterra, **Scientia Horticulturae** v. 63, n.3 - 4, p.251 - 261, 1995.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., *et al.* Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Shizuoka, Japão, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.12, p. 2346 - 2347, 1995.
- GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M., e Heller, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahupa, arracha, maca, yacon**: Promoting the conservation and use of understanding and neglected crops. Gater Slaben, Institute of plant genetics and crop plant research, 1997. Capítulo 21, pp. 199 - 241. Disponível em: <http://www.cipotato.org/market/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 20 de maio de 2002.
- GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Luhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.
- HOLA, Z.; MICHL, J. (Yacon (*Polymnia sonchifolia*), a non tradicional source of fructose). *Listy Cukorvarnické a Reparské*. Praga, República Checa, **Journal of Fruits Vegetables and Nuts**, v.110, n.7, p.194 - 196, 1996.

- KAPULER, A. M.; GURUSIDDIAH, S. The twenty protein amino acids free in the juices of our common vegetables and herbs. Connecticut, EUA, **Journal of Home and Consumer Horticulture**, v.1, n.1, p.3 - 18, 1994.
- KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.
- KURODA, S., ISHIRARA, J. Field growth characteristics of plantlets propagated *in vitro* and line selection for increased percentage of sugar in tuberous root of yacon, *Polymnia sonchifolia*. Kioto, Japão, **Bulletin of the Shikoku National Agricultural Experiment Station**, v.57, p.111 - 121, 1995.
- NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1402 – 1406S, Suppl. S, 1999.
- ROBINSON, H. Studies in the Heliantaeae (Astereceae). XII. Re-establishment of the genus *Smallanthus*. **Phytologia**, v. 39, n. 1, p. 47 – 53, 1978.
- SCHUBERT, S., FEUERLE, R. Fructan storage in tubers of Jerusalem artichoke: characterization of sink strength. **New Phytologist**, v.136, n.1, p.115 – 122, 1997.
- VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.
- VIETMEYER, N. D. (Edited by) - National Research Council. **Lost crops of the Incas little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation**. Washington Academy Press, 415p., 1989.

WEI, B.; HARA, M.; YAMAUCHI, R.; UENO, Y.; KATO, K. (Fructooligosaccharides in the tubers of Jerusalem artichoke and Yacon). Hokkaido, Japão, **Research Bulletin of the Faculty of Agriculture**, v. 56, p.133 - 138, 1992.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on "Yacon" *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). St. Louis, Estados Unidos, **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72 – 75, 1991.

CAPÍTULO 2: FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS: IMPLICAÇÕES NA SAÚDE HUMANA E SUA UTILIZAÇÃO.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Frutooligossacarídeos: Conceitos e produção

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de ocorrência natural, principalmente em produtos de origem vegetal, segundo HARTEMINK et al. (1997). São chamados açúcares não convencionais e têm tido impacto na indústria do açúcar devido às suas excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos fisiológicos e físicos (SPIEGEL et al., 1994). Atualmente FOS é o nome comum dado apenas a oligômeros de frutose que são compostos de 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄) (Figura 1.1), em que as unidades de frutose (F) são ligadas na posição beta-2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996).

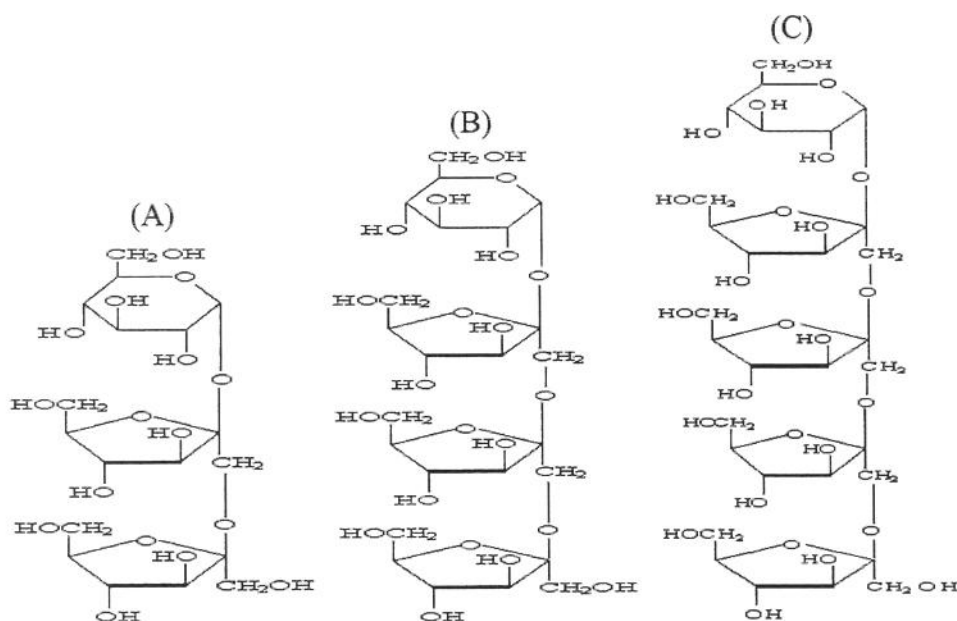


Figura 1.1: Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos : 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).

Os FOS podem ser divididos em dois grupos do ponto de vista comercial: o 1º grupo é o preparado por hidrólise enzimática de inulina, e consiste de unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose. Este produto é comercializado como "Raftilose", produzido pela Orafiti Ltda, da Bélgica, ou como "Frutafit", produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda. O grau de polimerização desses FOS varia entre 1 e 7 unidades de frutossil. A biossíntese de FOS ocorre amplamente na natureza, e esses oligossacarídeos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas, mais de 36 mil (ROBERFROID, 1993), principalmente em alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo, tomate, segundo discussão de YAMASHITA et al. (1984), SPIEGEL et al. (1994) e YUN (1996). Também podem ser encontrados no mel (STEYN, 1973) e açúcar mascavo, em tubérculos, como o yacon (OHYAMA et al., 1990, FUKAI et al., 1993, GOTO et al., 1995), e em bulbos, como os de lírios vermelhos (UCHIYAMA et al., 1985).

O 2º grupo é preparado por reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose, e consiste tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutossil. Esse produto é produzido pela Meiji Seika Ltda (Tóquio, Japão), e comercializado como "Neosugar", "Profeed", "Meioligo", ou "Nutraflora". O "Actilight" é produzido e comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (HIDAKA et al., 1986, HARTEMINK et al., 1997).

Estima-se que no meio-oeste da Holanda consuma-se entre 2 a 12 g de FOS por dia per capita (HARTEMINK et al., 1997). No Japão há consumo diário estimado em $13,7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (SPIEGEL et al., 1994). A aprovação de FOS no Japão estabeleceu como consumo diário aceitável cerca de $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia. Encontra-se neste país o maior mercado comercial de FOS, com um volume comercializado de mais de 400 toneladas em 1990 de acordo com YUN (1996), mostrando que os oligossacarídeos são um dos produtos mais populares como alimentos funcionais neste país. Os japoneses produziram U\$ 46 milhões de diferentes tipos de oligossacarídeos em 1990, e TOMOMATSU (1994)

projetou um mercado de alimentos funcionais no valor de U\$ 4,5 bilhões, com crescimento anual de 8% em 1995.

Como status legal os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares, na maioria dos países. São fibras dietéticas, confirmado pelas autoridades legais em vários países, e nos Estados Unidos possuem o status GRAS (Generally recognized as safe). A sua ingestão pode estar associada à flatulência, e isto se torna mais flagrante em indivíduos que possuem intolerância a lactose. A gravidade desse tipo de sintoma está associada à dose de FOS consumida, isto é, quanto menos FOS, menos sintomas. A ingestão de 20-30 g por dia geralmente desencadeia o início de um desconforto severo no indivíduo, sendo o ideal seguir as doses recomendadas de cerca de 10 g dia⁻¹ por pessoa. Comercialmente, os FOS são suplementos caros, a cerca de U\$ 0,20 por grama, o consumo nas doses recomendadas pode custar U\$ 2,00 por dia (ANÔNIMO C, 2001).

FOS e seus efeitos benéficos à saúde

BOUHNİK et al. (1996) demonstraram que a ingestão de FOS, em doses de 12,5 g dia⁻¹ por 3 dias (doses clinicamente toleradas), produziram efeitos significativos de queda na contagem de anaeróbios totais nas fezes, queda de pH, atividade de nitroredutases, azoredutases e beta glucoronidases, queda nas concentrações de bile ácida e esterol neutro, ou seja, leva ao aumento da colonização de bifidobactérias.

Os FOS possuem características específicas na prevenção de cáries dentárias, redução nos níveis séricos de colesterol total e lipídeos, além de atuarem como estimulantes do crescimento de bifidobactérias no trato digestivo (YAMASHITA et al., 1984, HIDAKA et al., 1986, MODLER et al., 1990, MODLER, 1994). Os FOS praticamente não são digeridos pelo metabolismo humano (MOLIS et al., 1996), e a maioria das bifidobactérias são capazes de fermentá-los em alguma extensão (HARTEMINK et al., 1997).

Existem vários estudos que comprovam os efeitos benéficos da ingestão de FOS. Esses açúcares não convencionais foram classificados como assistentes da “flora amigável” do trato intestinal, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*. Eles melhoram o metabolismo de *Bifidobacteria* e diminuem o pH do intestino grosso, destruindo bactérias putrefativas. A ingestão diária desses carboidratos pode resultar num aumento de bifidobactérias no trato intestinal (HARTEMINK et al., 1997). Os FOS são conhecidos como prebióticos, desde que promovem o crescimento de probióticos, como *Acidophilus*, *Bifidus* e *Faecium*, promovendo, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação de FOS na dieta ou uma suplementação intensificam a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal, mudando a composição de sua microbiota. Ao mesmo tempo, bactérias patogênicas incluindo *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e outras têm sido inibidas, concomitantemente (YAMASHITA et al., 1984, WANG & GIBSON, 1993, SPIEGEL et al., 1994, GIBSON & ROBERFROID, 1995, GIBSON et al., 1995).

Um estudo em que se administrou FOS em pacientes diabéticos, demonstrou um decréscimo significativo de *Clostridium* e um acréscimo na contagem de *Bifidobacteria*. Este estudo também reportou que os FOS promovem um alívio na constipação e desconforto intestinais (SANO, T. et al., 1986, citado por ANÔNIMO B, 1999). Os FOS diminuem os níveis de triglicerídeo sérico e aumentam a produção de ácidos graxos voláteis (HIDAKA et al., 1986). Testes de laboratório demonstraram que a absorção de minerais como cálcio, magnésio e fósforo aumenta quando da ingestão de FOS. Também há redução de inflamação decorrente da deficiência de magnésio (OHTA et al., 1993, 1994, 1995a, 1995b).

O equilíbrio produzido na flora gastrointestinal pelo consumo de FOS estimula outros benefícios no metabolismo humano, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, normalizando a pressão sanguínea e lipídeos séricos e melhoria do metabolismo de diabéticos (YAMASHITA et al., 1984, SPIEGEL et al., 1994). Ainda pode-se observar um

aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno, aumento da síntese de vitaminas (principalmente do complexo B), aumento da produção de compostos imuno estimulantes, que possuem atividade antitumoral, diminuição do crescimento de bactérias nocivas, diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal normal durante terapia com antibióticos. Também atribui-se ao consumo de FOS a redução da potencialidade de várias patologias humanas normalmente associadas com o alto número de bactérias intestinais patógenas, como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (YUN, 1996).

YAMAMOTO et al. (1999) detectaram uma queda de 83% e 59% de colesterol sérico em ratos alimentados com 1 e 5% de FOS, respectivamente. Este efeito foi acompanhado pelo aumento significativo de excreção de esteróis e lipídeos nas fezes. No entanto, o mesmo estudo concluiu que a hipocolesterolemia resultou mais pela prevenção de absorção intestinal de colesterol pelos FOS que pelo produto de fermentação dos mesmos, pois carboidratos que são digeridos no intestino grosso podem afetar a absorção de certos minerais. A suplementação da dieta de ratos com 1, 2 e 5% de FOS diminui o pH intestinal (quanto mais FOS menor o pH) e aumenta linearmente a absorção de magnésio. Os macrominerais (Ca, P, Mg, Na, Cl e K) ficaram com balanço positivo para os 3 tratamentos (WOLF et al., 1998).

LOPEZ et al. (2000) estudaram a ingestão, por ratos, de diferentes dietas, sendo dieta livre de fibras, dieta livre de fibras + 7g kg⁻¹ de ácido fítico (um anti fator para a absorção de minerais), dieta contendo 100 g kg⁻¹ de FOS e dieta contendo FOS + 7 g kg⁻¹ de ácido fítico. Concluíram que a dieta com FOS aumentou a absorção de Ca⁺² e Mg⁺² no intestino. A absorção aparente de minerais aumentou significativamente pela ingestão de FOS (Ca⁺² + 20%, Mg⁺² + 50%, Fe⁺² + 23%, Cu⁺² + 45%), e diminuiu pela ingestão de ácido fítico para elementos traço (Fe⁺² - 48%, Zn⁺² - 62%, Cu⁺² - 31%). A dieta livre de fibras adicionada de ácido fítico promoveu repercussão negativa no sangue (diminuição

de Mg^{+2} e Fe^{+2}), fígado (diminuição de Mg^{+2} , Fe^{+2} e Zn^{+2}) e ossos (diminuição de Zn^{+2}). No entanto, a introdução de FOS na dieta de ácido fítico combate estes efeitos negativos, estimulando a hidrólise bacteriana do ácido fítico e melhorando a absorção intestinal dos minerais.

SAKAI et al. (2000) fizeram uma comparação entre o efeito dos FOS de cadeias curta e longa (inulina) em ratos, após anemia decorrente de gastrectomia. Feitas as determinações de concentrações de hemoglobina e hematócritos, a dieta com FOS de cadeia curta obteve concentrações significativamente maiores que as dietas controle e com inulina. Concluíram que o efeito dos FOS de cadeia curta é muito mais forte na recuperação deste tipo de anemia que o efeito da inulina.

Estudos conduzidos por WOLF et al. (1997) com hamsters fêmeas acometidas de infecção por *Clostridium difficile* demonstraram que a suplementação com FOS em suas dietas aumentou o seu tempo de sobrevivência. Essa suplementação pode ser benéfica a pacientes com longo tempo de internação hospitalar, que possuam risco de infecção por *C. difficile*.

A adição de FOS na dieta de ratos é capaz de reduzir em 20 a 30% o nível de uréia no sangue e nos rins, e na excreção de N renal (comparado aos controles, sem FOS), indicando o potencialidade dos FOS em terapias de doenças renais crônicas, segundo YOUNES et al. (1995).

Características e aplicações dos FOS

Os FOS possuem características que permitem sua aplicação em várias áreas. Como apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos. Têm solubilidade maior que a da sacarose, não cristalizam, não precipitam, e nem deixam sensação de secura ou areia na boca. Os FOS não são degradados durante a maioria dos processos de aquecimento, mas podem ser hidrolisados

em frutose em condições muito ácidas e em condições de exposição prolongada de determinados binômios tempo / temperatura (BORNET, 1994 e YUN, 1996).

Devido essas características os FOS podem ser usados em formulações de sorvetes e sobremesas lácteas que levem no rótulo “açúcar reduzido”, “sem adição de açúcar”, “calorias reduzidas”, produto sem açúcar”, etc., em formulações para diabéticos, em produtos “funcionais” que promovam efeito nutricional adicional nas áreas de prebióticos, simbióticos, fibras dietéticas, em iogurtes, promovendo efeito simbiótico (além do próprio efeito probiótico do iogurte), em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar, produtos para diabéticos, etc., em barras de cereais, sucos e néctares frescos, produtos de confeitaria, molhos, etc. (ANÔNIMO A, 2001). Também podem ser utilizados em produtos alimentares para animais, com os mesmos efeitos prebióticos (STRICKLING et al., 2000). Os FOS são usados como aditivos alimentares para suínos e aves domésticas (FISHBEIN et al., 1988).

Especificamente em formulação de barras de cereais, a utilização dos FOS pode variar de acordo com a sua finalidade. As barras consumidas no desjejum consistem tipicamente de altos níveis de carboidratos, pouca proteína, pouca gordura e pouca fibra. A substituição de parte dos carboidratos (geralmente sacarose, frutose, amido e maltodextrinas) por FOS, pode aumentar a quantidade de fibras desta categoria de barras, melhorando suas características nutricionais. Barras consumidas com diferentes finalidades, como por exemplo, barras energéticas para praticantes de esportes, e aquelas usadas como alimentos funcionais especificamente também são adicionadas de FOS (IZZO et al., 2001).

Estudos recentes (HONDO et al., 2000) indicam a possibilidade de produzir vinagre de yacon contendo frutooligossacarídeos naturais, contidos no próprio yacon. Há também a possibilidade da suplementação de alimentos infantis com frutooligossacarídeos de alto peso molecular e galactooligossacarídeos de baixo peso molecular, no intuito de facilitar o trânsito intestinal de recém nascidos (MORO et al., 2002). Os FOS também podem ser usados em outros tipos de indústrias que não as de alimentos (YUN, 1996).

Referências Bibliográficas

- ANÔNIMO A. **Info1 c: Fructooligosaccharides**. Capturado em 28 ago. 2001. Online. Disponível na Internet <http://maxpages.com>.
- ANÔNIMO B. **Latest research on elderberry pro...eimer's disease, phosphatidylserine**. Capturado em 20 dez. 1999. Disponível na Internet <http://www.nutritiondynamics.net>.
- ANÔNIMO C. **Supplemets A – Z**. Capturado em 23 ago. 2001. Disponível na Internet <http://supplementwatch.com>.
- BORNET, F. R. Undigestible sugars in food products. Paris, França, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n. 3 Supl, p.763S – 769S, 1994.
- BOUHNİK, Y., FLOURIE, B., RIOTTOT, M., et al. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. Paris, França, **Nutritional Cancer**, v.26, n.1, p.21 – 29, 1996.
- FISHBEIN, L., KAPLAN, M., GOUGH, M. Fructooligosaccharides: a review. Washington, Estados Unidos, **Veterinary and Human Toxicology**, v.30, n.2, p.104 – 107, 1988.
- FUKAI, K., MIYAZAKI, S., NANJO, F., et al. Distribution of carbohydrates and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Fujieda, Japão, **Soil Science and Nutrition**, v.39, n.3, p. 567 – 571, 1993.
- GIBSON, G. R., BEATTY, E. R., WANG, X., et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Cambridge, Inglaterra, **Gastroenterology**, v.108, n.4, p. 975 – 982, 1995.

- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Cambridge, Inglaterra, **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401 – 1412, 1995.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Shizuoka, Japão, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.12, p. 2346 – 2347, 1995.
- HARTEMINK, R., VANLAERE, K.M.J, ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Wageningnen, Holanda, **Journal of Applied Microbiology**, v.383, p. 367-374, 1997.
- HIDAKA, H., EIDA,T., TAKIZAWA, T., et al. Effects of fructooligosaccharids on intestinal flora and human health. Tokio, Japão, **Bifidobacterium Microflora**, v. 5, p. 37-50, 1986.
- HONDO, M., OKUMURA, Y., YAMAKI, T. A preparation of yacon vinegar containing natural fructooligosaccharides. Hokkaido, Japão, **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 47, n. 10, p. 803 – 807, 2000.
- IZZO, M., NINESS, K. R. Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. Malvern, **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 102 – 106, 2001.
- LOPEZ, H. W., COUDRAY, C., LEVRAT-VERNY, M. A., et al. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. Clermont-Fd/Theix, França, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.500 – 508, 2000.

- MODLER, H. W., MCKELLAR, R.C., YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. Kamptville, Canadá, **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, v. 23, p. 29-41, 1990.
- MODLER, H. W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. Kamptville, Canadá, **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.
- MOLIS, C., FLOURI, B., OUARNE, F., et al. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. Nantes, França, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.3, p. 324 – 328, 1996.
- MORO, G., MINOLI, I., MOSCA, M., et al. Dosage-related effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. Milão, Itália, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 291 – 295, 2002.
- OHTA, A., OSAKABE, N., YAMADA, K., et al. Effects of fructooligosaccharides and other saccharides on Ca, Mg and P absorption in rats. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Japanese Nutrition and Food Science**, v.46, n.2, p.123 – 129, 1993.
- OHTA, A., BABA, S., TAKIZAWA, T., et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium in the magnesium-deficient rats model. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.40, p.171 – 181, 1994.
- OHTA, A., OHTSUKI, M., BABA, S., et al. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutrition**, v.125, p.2417 – 2424, 1995a.

- OHTA, A., OHTSUKI, M., BABA, S., et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.41, p.281 – 291, 1995b.
- OHYAMA, T., ITO, O., YASUYOSHI, S., et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Tsukuba / Ibaraki, Japão, **Soil Science and Plant Nutrition**, v.36, n.1, p.167 – 171, 1990.
- ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparin their physiological effects. Cambridge, Inglaterra, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.2, p.103 – 108, 1993.
- SAKAI, K., OHTA, A., TAKASAKI, M., et al. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. Sakado, Japão, **Nutrition Research**, v.20 n.3, p.403 – 412, 2000.
- SPIEGEL, J. E., ROSE, R., KARABELL, P., et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Boston, Estados Unidos, **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.
- STEYN, D.G. Honey. In: BIRCH, G.G., GREEN, L.F. (ed) **Molecular structure on function of food carbohydrate**. New York – Toronto. John Wiley & Sons, 1973. p. 35 – 207.
- STRICKLING, J. A., HARMON, D. L., DAWSON, K.A., et al. Evaluation of oligosaccharides addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. Topeka, Estados Unidos, **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205 – 219, 2000.

- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. Tanashi, Japão, **Food Technology**, v. 8, p. 61-65, 1994.
- UCHIYAMA, T., YONEDA, I., MURAKAMI, Y., et al. Identification of fructooligosaccharides from the bulbs of *Lycoris radiata* Herbert. Osaka, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.11, p.3315 – 3317, 1985.
- WANG, X., GIBSON, G. R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Cambridge, Inglaterra, **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, n.4, p.373 – 380, 1993.
- WOLF, B. W., MEULBOROEK, J. A., JARVIS, K. P., et al. Dietary supplementation with fructooligosaccharides increase survival time in a hamster model of *Clostridium difficile*-Colites. Columbus, Estados Unidos, **Bioscience Microflora**, v.16, n.2, p.59 – 64, 1997.
- WOLF, B. W., FIRKINS, J. L., ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. Columbus, Estados Unidos, **Nutrition Research**, v.18, n. 10, p.1791 – 1806, 1998.
- YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, Y., KAWANO, M., et al. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and it hypocholesterolemic effects in rats. Osaka, Japão, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, p.13 – 18, 1999.
- YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. Fukuoka, Japão, **Nutrition Research**, v. 4, p. 961-966, 1984.
- YOUNES, H., GARLEB, K., BEHR, S., et al. Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal

in the rat cecum. St-Genes Champanelle, França, **Journal of Nutrition**, v.125, n.4, p.1010 – 1016, 1995.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. Kyungbug, Coréia, **Enzymes and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.

CAPÍTULO 3: INVERTASES E SUAS FUNÇÕES NO METABOLISMO DE

PLANTAS SUPERIORES.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Introdução

A invertase é uma enzima hidrolase, também denominada β -D-frutofuranosidase. A β -frutofuranosidase é amplamente encontrada na natureza, e está presente em plantas, animais e microrganismos (WHITAKER, J. R., 1994). Invertases têm um papel chave no metabolismo de sacarose de plantas superiores, apesar de não se saber ainda quais são todas as funções exercidas pela enzima e como atua. Invertases de plantas podem preencher diferentes papéis em todo o metabolismo de açúcares, transporte e armazenamento, pela regulação da concentração de sacarose em locais específicos (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995).

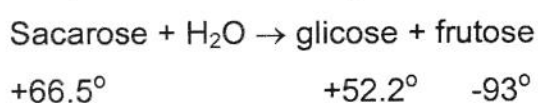
A investigação das funções de invertases no metabolismo de diferentes plantas pode facilitar a compreensão e o estudo do metabolismo deste mesmo tipo de enzima em outras plantas superiores. Este trabalho mostra diferentes funções de enzimas β -frutofuranosidases em alguns dos principais estudos realizados a respeito. As invertases são enzimas importantes, e bastante usadas na confecção de eletrodos e na indústria de alimentos.

Definição e modo de ação

A invertase é uma enzima hidrolase, também denominada β -D-frutofuranosidase, e sua numeração junto a comissão internacional de enzimologia (Enzyme Commission) é EC 3.2.1.26. Isto corresponde dizer que é uma hidrolase (número 3), que hidrolisa ligações glicosil (número 2), especificamente ligações O-glicosil (número 1). O número 26 corresponde ao número de série da enzima.

As hidrolases têm como segundo substrato a água. A hidrólise da glicose pode envolver a quebra da ligação C(1)-O ou O-C(2). Se a ligação C(1)-O for quebrada, a glicose vai conter o resíduo OH da água, enquanto na quebra da ligação O-C(2) é a frutose que vai ficar com este resíduo OH.

Trabalhos experimentais com enzimas que degradam a sacarose, β -frutofuranosidase apresentam um paradoxo. Por um lado é uma enzima popular porque sua ação pode ser acompanhada continuamente com base no desvio da luz polarizada. Por outro lado, é muito difícil obtê-la em um grau satisfatório de homogeneidade. A razão é a natureza glicoprotéica da molécula. A reação catalisada pela enzima é a seguinte:



onde os números abaixo dos compostos correspondem a rotação ótica específica. A velocidade da reação pode ser acompanhada pelo desvio da luz polarizada, desde que há uma mudança na rotação de 87° . Devido a inversão de rotação ($+66.5^\circ$ para -20.5°) na solução durante a reação, a enzima foi chamada invertase.

A β -frutofuranosidase é amplamente encontrada na natureza, e está presente em plantas, animais e microrganismos. Há dois tipos de enzimas que podem hidrolisar a sacarose: β -frutofuranosidase e α -glicosidase. A ligação glicosídica da sacarose envolve os grupos redutores tanto da D-glicose quanto da D-frutose. A β -frutofuranosidase hidrolisa a ligação glicosídica entre C(2) e O, e a α -glicosidase hidrolisa a ligação entre C(1) e O. A melhor forma de distinguir entre as duas enzimas é pelo uso de dois trissacarídeos, rafinose e melizitose. A α -glicosidase é específica pela metade glicose da sacarose, incluindo a posição C(6). A modificação deste C(6) previne a α -glicosidase de hidrolisar a rafinose. Na melizitose o resíduo glicosil aderido à frutose não é modificado, e então a α -glicosidase pode hidrolisá-la. Esta conversão é verdadeira para β -frutofuranosidase. A especificidade está diretamente ligada a metade frutose da sacarose, e a modificação desta parte, como na melizitose, previne o composto de

ser substrato, enquanto a rafinose é substrato para a β -frutofuranosidase (WHITAKER, J. R., 1994).

Metabolismo em plantas superiores

O metabolismo das plantas superiores em si implica na existência de pelo menos duas diferentes invertases em seus tecidos (CHENG et al., 1990). Invertases (β -D-frutofuranosidases) têm um papel chave no metabolismo de sacarose destas plantas. A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose com ligação β , 2-1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosidases presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992). A presença de dois tipos de invertases, com suas compartimentalizações espaciais nas células das plantas, e suas propriedades bioquímicas únicas, pode permitir controles independentes do metabolismo, translocação e armazenamento de sacarose. Pode também facilitar indiretamente o armazenamento de hexoses, e seu subsequente ingresso no metabolismo intermediário em vários outros tipos de células da planta (CHEN et al., 1992).

No citosol das plantas superiores a sacarose pode ser hidrolisada por uma invertase neutra ou uma sacarose sintase, gerando hexoses fosfato como substrato para a respiração, para síntese de polissacarídeos estruturais e possível formação de amido. Por outro lado, a sacarose pode ser transportada para o vacúolo, onde é armazenada como tal ou polimerizada em frutanas, como inulina em Asteraceae (por exemplo, espécies de *Cichorium*, *Helianthus*, *Taraxacum*, *Dalhia*), ou em cadeias mais complexas de frutanas, como ocorre em outros gêneros de plantas. Desta maneira, as invertases de plantas podem preencher seus diferentes papéis em todo o metabolismo de açúcares, transporte e armazenamento, pela regulação da concentração de sacarose em locais específicos (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995). A função fisiológica das diversas invertases é difícil de se compreender totalmente, mas é possível que várias isoenzimas de invertase sejam ativas em diferentes microambientes, que

variem em grau de acidez (GUPTA et al., 1991). Apesar de quase um século de estudos, muitas questões a respeito das funções desta enzima ainda não foram elucidadas (CHEN et al., 1992).

Usualmente as invertases de plantas são nomeadas de acordo com seu pH de atuação e sua localização espacial: extra ou intra celular, formas solúvel ou insolúvel. As formas extracelulares geralmente estão envolvidas na translocação e quebra da sacarose. Baseado em seu pH ótimo, as enzimas podem ser divididas em ácidas, pH 4,5 – 5,0, e alcalinas, pH 7,0 – 7,8. Quanto a suas funções, as invertases ácidas aparentam estar relacionadas com o crescimento e a diferenciação de alguns tecidos das plantas, particularmente com organelas de alongamento e alargamento das células.

O modelo de biossíntese de frutanas proposto por EDELMAN e JEFFORD (1968) divide as enzimas em: 1-SST (sacarose: sacarose frutossil transferase), que catalisa a síntese do trissacarídeo GF₂ de 2 moléculas de sacarose, enquanto a 1-FFT (frutose: frutose frutossil transferase) media a redistribuição de unidades frutossil entre GF₂ e frutanas maiores.

A existência de SST, uma enzima que predominante ou exclusivamente catalisa a síntese do trissacarídeo GF₂ a partir de sacarose, tem sido demonstrada, não inequivocamente, pelo menos em Asteraceae. Uma enzima purificada de chicória pode realizar a síntese de GF₂ a partir de sacarose em nível não fisiológico, mas pode catalisar preferencialmente a hidrólise de sacarose em concentrações abaixo de 400 μmol. A enzima da chicória foi então denominada invertase (KOOPS et al., 1996).

Uma inspeção em várias reações enzimáticas do metabolismo de frutanas revela uma importante diferença qualitativa entre SST e enzimas sucrase (reações 1 e 3 respectivamente), e a reação da FFT (2).

Reação 1: G-F + G-F (**SST**) → G-F-F + G

Reação 2: G-F-(F)_n + G-F-(F)_m (**FFT**) → G-F-(F)_{n-1}

Reação 3: G-F + G-(F)_n (**sucrased**) → G-(F)_{m+1} + G.

A SST e a sucrase catalisam a síntese *de novo* de frutanas, a partir de sacarose. A FFT requer como substrato frutanas pré formadas, e catalisa a redistribuição do

terminal frutose entre as cadeias de frutanas. Neste caso, nenhuma rede de síntese de frutanas ocorre.

As invertases são componentes enzimáticos comuns em tecidos de plantas. Por isso e por outras razões, a invertase pode complicar a interpretação de dados de SST. Em particular, a invertase catalisa a síntese de trissacarídeos a partir de sacarose, e exibe uma cinética similar à da SST. A invertase também catalisa a síntese de oligofrutanas de grau de polimerização maior que 3, então sua presença pode levar ao aparecimento dos produtos das Reações 1, 2 e 3. A invertase catalisa a síntese de frutanas somente quando há altas concentrações de sacarose. A reação é essencialmente hidrolítica, e o produto frutana é transitório. Não há razão para acreditar que a transferência de frutossil por invertase seja de significância fisiológica (em tecido) (CAIRNS, 1993).

Invertases ácidas geralmente são encontradas em tecidos imaturos de plantas superiores. Aparentemente invertases neutras são mais comuns em tecidos mais maduros e armazenados de plantas que acumulam sacarose, como cana de açúcar, cenoura, beterraba, etc. Para estas plantas, parece haver uma relação positiva entre o conteúdo de sacarose e a atividade de invertase neutra; ao contrário, em mesocarpos de cogumelos em desenvolvimento, a atividade de invertases neutras diminui com o acúmulo de sacarose (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995). A invertase ácida, presumivelmente compartimentalizada nos vacúolos, primeiramente atua em tecidos em rápido crescimento e desenvolvimento, quando as hexoses são rapidamente utilizadas e sacarose rapidamente hidrolisada. Em tecidos de armazenamento maduros, a presença de uma invertase ácida altamente eficiente é desnecessária e até indesejável. Uma menos eficiente, a invertase alcalina citoplasmática ou sacarose sintetase, pode satisfazer os requerimentos de sacarose para as células de armazenamento (SCHAFER, 1986).

A literatura traz muitos estudos a respeito da atividade de enzimas do tipo invertase, e do metabolismo de carboidratos. Em folhas de *Tropaelum* a atividade de invertases alcalinas e neutras aumenta na maturidade dos tecidos de armazenamento. Quando a atividade das invertases ácidas desaparece, a

atividade das invertases neutras provavelmente toma lugar das invertases ácidas insolúveis. As invertases ácidas geralmente aparecem com mais freqüência que as neutras. As folhas de *Tropaelum* apresentam pelo menos 2 grupos de invertases ácidas solúveis, as β -frutofuranosidases, que parecem ser reguladas pela frutose, e cuja atividade é modificada competitivamente por frutose somente na ausência de proteínas (ISLA et al., 1988).

Estudos feitos por KAUR et al. (1992) mostraram que o caule da chicória armazena inulina como reserva de carboidratos. A inulina acumulada é parcialmente hidrolisada durante o desenvolvimento para suportar a emergência do broto de caules reduzidos. Depois estes brotos viram flores e sementes. Neste estágio, detecta-se inulinase, mas não invertase nas raízes da chicória. A invertase está presente nas raízes no momento ativo da síntese de frutanas, mas a inulinase não é detectada. A inulinase pode quebrar a ligação frutofuranosídica β -2,1 no terminal não redutor de pequenos oligossacarídeos: sacarose, inulina, estaquiose, rafinose. É, no entanto, diferente da invertase, que possui alta atividade em sacarose e muito pouca em inulina (MUKHERJEE et al., 1987).

Em folhas jovens de cítricos, a fração ácida de invertase mostrou atividade em rafinose, mas não em melizitose, indicando ser uma β -frutofuranosidase. A atividade alcalina de folhas maduras foi efetiva tanto em rafinose quanto em melizitose, indicando uma mistura de enzimas (SCHAFFER, 1986).

A transformação da invertase durante o desenvolvimento das plantas tem sido reportada. Por exemplo, a cana de açúcar tem invertase ácida em seu tecido imaturo de armazenamento, que é substituída por invertase alcalina no tecido maduro. Foi mostrado também que há um decréscimo de invertase ácida e um acréscimo de invertase alcalina durante o desenvolvimento de cenouras (SCHAFFER, 1986).

A invertase alcalina deve regular a síntese e o consumo de sacarose, desde que o seu nível de atividade está relacionado com o acúmulo de sacarose durante a maturação. A sua atividade dificilmente é detectada em raízes maduras de beterrabas, mas está presente em caules de cana de açúcar. Um trabalho de MASUDA et al. (1987) demonstrou que a invertase alcalina está presente em

raízes maduras de beterraba, e que sua atividade está intimamente ligada ao acúmulo da sacarose durante o seu desenvolvimento. O alargamento da beterraba e o acúmulo substancial de sacarose iniciou-se 52 dias após a semeadura, e depois cresceu paralelamente até 125 dias. O conteúdo de açúcares redutores e amido era extremamente baixo durante o crescimento. A atividade da invertase ácida era muito alta no 1º estágio de crescimento, diminuindo rapidamente quando as raízes começaram a acumular sacarose, e quase desaparecendo nas raízes maduras. A invertase alcalina esteve ausente nos tecidos imaturos antes do acúmulo de sacarose. Sua atividade apareceu no 52º dia, e continuou aumentando até o 112º dia. Neste período, o conteúdo de sacarose pareceu subir em nível constante. Estes resultados indicam que a invertase alcalina de beterraba está intimamente relacionada com o acúmulo de sacarose durante o desenvolvimento da raiz, sugerindo que esta enzima está envolvida na regulação do acúmulo e uso do açúcar.

O dente de leão, assim como um considerável número de *Compositae*, contém em suas raízes uma série de β -frutofuranosidases. Já foi demonstrado que o armazenamento de chicória e dente de leão, e de raízes de alcachofra a baixas temperaturas leva a quebra de inulina e oligossacarídeos de alto peso molecular a oligossacarídeos de menor grau de polimerização. As enzimas hidrolíticas responsáveis por esta despolimerização de polissacarídeos a açúcares mais simples já foram caracterizadas para alcachofras e chicória, e aparentemente estão presentes em dente de leão. Neste último foram isoladas 2 hidrolases (A e B), ambas inativas contra sacarose, mas ambas hidrolisam inulina e oligossacarídeos (pH ótimo 4). Uma invertase foi isolada, e não possui atividade contra inulina e oligossacarídeos, mas sim contra sacarose (pH ótimo 7,5). Portanto, as invertases de dente de leão atuam em partes frutossil ligadas a resíduos de glicosil, e hidrolases atuam em partes frutossil ligadas a resíduos de frutossil (RUTHERFORD e DEACON, 1972).

Invertases ácidas e neutras foram encontradas no mesocarpo de melões em desenvolvimento. A atividade dessas enzimas diminui com a maturação da fruta, concomitantemente com o acúmulo de sacarose. As frutas imaturas contêm

a maior atividade de invertases, tanto solúveis quanto ligadas. A atividade diminui em frutas maduras. A função da invertase neutra na fruta do melão parece ser diferente da função da mesma enzima em outras espécies. O rápido declínio da atividade da invertase ácida durante o desenvolvimento da fruta suporta a sugestão feita por outros pesquisadores de que este decréscimo é um pré requisito para o acúmulo de sacarose, em melões (RANWALA et al., 1991).

As invertases de pólen de lírio são β -frutofuranosidases que hidrolisam sacarose, mas não a melizitose. A sacarose representa a maior parte de açúcares solúveis presente em grãos de pólen, e também é o açúcar natural mais detectado em substratos para germinação do mesmo. A germinação de grãos de pólen é extremamente rápida, e por isso pedem uma grande demanda de fonte de carbono para a síntese da parede do pólen, assim como substrato para a respiração. A invertase de lírio hidrolisa sacarose, rafinose e estaquiose, sendo que há maior especificidade para o dissacarídeo sacarose, seguido do trissacarídeo rafinose e depois o tetrassacarídeo estaquiose (SINGH e KNOX, 1984).

A cenoura possui uma β -frutofuranosidase insolúvel, ligada ionicamente à parede celular, e pelo menos 2 outras diferentes e solúveis que se localizam dentro da célula. Cenouras jovens são muito ricas em β -frutofuranosidase solúvel e contém muito pouca β -frutofuranosidase ligada à parede, enquanto cenouras desenvolvidas possuem muita β -frutofuranosidase ligada à parede e muito pouca β -frutofuranosidase solúvel. Sugere-se que a β -frutofuranosidase solúvel participa da regulação de hexoses nos tecidos maduros de cenoura e na utilização de sacarose armazenada nos vacúolos (UNGER et al., 1992).

As invertases de cana de açúcar são encontradas em diversas isoformas: invertase neutra, invertase vacuolar ácida, invertase ligada a parede, e invertase ácida apoplástica solúvel (VORSTER et al., 1998).

Pelo menos 5 categorias diferentes de enzimas, baseado na especificidade pelo substrato e mecanismos de ação, capazes de degradar frutanas foram identificados em fungos e bactérias. No entanto, na maioria dos trabalhos há dúvidas a respeito da natureza específica das ligações hidrolisadas por essas

enzimas. Na maioria das plantas os complexos de frutanas contêm tanto ligações β -2,1 quanto β -2,6. Em contraste, plantas como *Chicorium*, *Dahlia* e *Inula* armazenam oligômeros contendo somente ligações β - 2,1. Neste trabalho HENSON et al. (1998) isolaram enzimas de cevada, com a presença de apenas uma isoforma que degrada ligações β - 2,1. Esse resultado foi diferente em relação a outros trabalhos em que foram encontradas múltiplas isoformas em folhas de *Lolium rigidum* e também em folhas de cevada. A presença de proteínas contaminantes no preparado enzimático parcialmente purificado não influenciou nas características cinéticas da enzima de interesse.

Foi estudada por TANASE et al. (2000) a relação entre as enzimas do metabolismo da sacarose e o desenvolvimento da pêra japonesa. As atividades das invertases ácidas, tanto solúvel quanto a ligada a parede, que era alta no fruto jovem, diminuem rapidamente durante a maturação. Os resultados do trabalho indicam que 2 isoenzimas de sacarose sintase exercem funções diferentes. Uma catalisa a síntese de sacarose, que contribui para o acúmulo de sacarose durante a maturação, enquanto outra facilita a quebra da sacarose junto com a invertase ácida, fornecendo substrato para o crescimento de frutos jovens.

O cultivo de aspargos é muito influenciado por fatores ambientais, particularmente a temperatura. Os carboidratos são os maiores componentes do aspargo, principalmente a asparagose e frutanas, enquanto que os caules possuem mais carboidratos solúveis, como sacarose, frutose e glicose. É importante entender o metabolismo destes açúcares e suas enzimas. As enzimas características do metabolismo da sacarose, como invertase ácida, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase estão presentes nos talos dos aspargos. Ocorrem várias modificações pós colheita nos aspargos. BHOWMIK et al. (2001) constataram um aumento de atividade de invertase com o aumento da temperatura. Geralmente isto ocorre até determinado ponto, quando então a atividade diminui quando a temperatura aumenta.

PAVLINOVA et al. (2001) estudaram o metabolismo das enzimas relacionadas à síntese de sacarose em folhas de beterraba. A atividade de invertase ácida solúvel foi característica em folhas jovens. Nas folhas maduras, a

atividade desta enzima está correlacionada ao período diurno. Estas mudanças ocorreram devido ao baixo conteúdo de sacarose nas folhas. A compartimentalização das enzimas estudadas nas células de fotossíntese é importante no transporte, metabolismo e funções osmóticas da sacarose nas folhas.

As atividades de enzimas do metabolismo de sacarose e frutose foram medidas por DRUART et al. (2001) em plantas de chicória durante o crescimento vegetativo precoce. Numa primeira fase, 21 a 42 dias após a semeadura, os carboidratos foram usados para crescimento estrutural, e a sacarose foi clivada predominantemente por invertase ácida, enquanto a atividade de invertases neutras e sacarose sintase era baixa. A atividade da invertase ácida foi aumentando gradualmente durante a fase 1, e manteve-se alta durante a fase 2 (49 a 63 dias após a semeadura). Depois disso a atividade diminuiu.

Utilização das invertases

A invertase catalisa a quebra hidrolítica de sacarose em frutose e glicose, e a mistura resultante cristaliza mais rápido que o açúcar caseiro (somente sacarose). A sua utilização em produtos de confeitaria faz com que estes pareçam ou se mantenham mais frescos e macios mesmo quando mantidos por um longo período de tempo. A invertase solúvel é empregada na indústria de doces e na produção de cremes que não cristalizam, e para produzir marzipã amaciado. Também é utilizada na produção de mel artificial (xarope de frutose).

Invertases têm sido usadas na construção de diferentes eletrodos. A construção é feita pelo revestimento de invertase em matrizes de polímeros condutores. A imobilização de enzimas em matrizes inertes propicia fácil recuperação e uso repetido, solucionando o problema de usar a enzima só uma vez. Outras vantagens incluem a fácil determinação analítica em misturas complexas e a utilização de volumes de amostras pequenos. A imobilização de invertase em gelatina, partes de carboidratos e polieletrólitos tem sido feita.

Recentemente a incorporação da enzima em matrizes de polímeros condutores ou por eletropolimerização têm sido reportados (KIZILYAR et al., 1999).

Células comerciais de levedura de pão foram imobilizadas por adesão numa fábrica de tecido de juta usando polietilenimina. A adesão foi forte e as células não foram eluídas em condições extremas de pH (3 – 10). Não foi detectada nenhuma mudança no comportamento da invertase presente nas células imobilizadas. O cilindro foi projetado para ser usado na produção de inversão de xarope de sacarose. A coluna operou por 45 dias a 45°C sem perda de eficiência (D'SOUZA et. al., 2001).

A invertase de fermento de pão (levedura) também tem sido utilizada num preciso método de análise de carboidratos: cromatografia de alta performance de troca iônica com detecção de pulso amperométrico. É aplicada em estudos de hidrólise de sacarose em condições enzimáticas. A hidrólise é monitorada pela determinação da degradação da sacarose e correspondente formação de D-frutose e D-glicose, além de outras frutanas (FARINE et al., 2001).

AHMAD et al. (2001) realizaram um estudo utilizando como suporte lecitina de *Cajanus cajan* para imobilização de glicoenzimas contendo resíduos de manose ou glicose em sua parte carboidrato. A imobilização de invertase exibiu alta resistência à inativação quando exposta a aumentos de temperatura e pH, desnaturação e proteólise. A invertase também apresentou estabilidade por um mês e reteve mais de 80% da atividade inicial, mesmo após 60 dias estocada a 60° C.

Microesferas magnéticas de polivinilalcool foram usadas em ligações covalentes na imobilização de invertases. A enzima imobilizada reteve 74% da atividade inicial, e seu Km foi maior que para a enzima livre. A estabilidade térmica e ao armazenamento aumentaram para a enzima imobilizada (AKGOL et al., 2001).

Um modelo experimental usando biomassa de leveduras, que contém invertase, foi feito para ser usado em membrana inorgânica de microporo para um processo separativo e para determinar parâmetros de filtração. A atividade

específica da enzima preparada pode ser comparada à da enzima comercial (RODRIGUEZ et al., 2000).

Glicose e frutose foram medidos por um método amperométrico usando técnica de análise de injeção de fluxo. O eletrodo usado continha, entre outras, a enzima invertase. Este eletrodo determinou a concentração de glicose e sacarose com erros inferiores a 3%. O método proposto para medidas de glicose e sacarose foi validado em amostras reais de suco de frutas (GUEMAS et al., 2000).

A invertase tem sido imobilizada em diferentes suportes, entre eles sílica amilopropil ativada com glutaraldeído. Comparada à esta, a sílica amilopropil ativada com substâncias húmicas foi capaz de imobilizar uma quantidade maior de invertase (3700 U/g contra 3300 U/g) (ROSA et al., 2000).

Referências Bibliográficas

- AHMAD, S., ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. Uttar Pradesh, Índia, e Denver, Estados Unidos, **Bioresource Technology**, n. 79, v. 2, p. 121 – 127, 2001.
- AKGOL, S., KACAR, Y., DENIZLI, A., ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. Ankara, Turquia, **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 281 – 288, 2001.
- BHOWMIK, P. K., MATSUI, T., KAWADA, K., SUZUKI, H. Seasonal changes of asparagus spears in relation to enzyme activities and carbohydrate content. Kawaga, Japão, **Scientia Horticulturae**, v. 88, p. 1 – 9, 2001.
- CAIRNS, A. J. Evidence for *the de novo* synthesis of fructan by enzymes from higher plants: a reappraisal of the SST / FFT model. Aberystwyth, Reino Unido, **New Phytologist**, v. 123, p. 15 – 24, 1993.
- CHEN, J. Q., BLACK, C.C. Biochemical and immunological properties of alkaline invertase from sprouting soybean hypocotyls. Athens, Estados Unidos, **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v. 295, n. 1, p. 61 – 69, 1992.
- CHENG, J. F.; MITSUYA, N.; JUANG, R. H.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of invertase isosymes from bamboo shoots. Taipei, Tailândia, **Biochemistry International**, v. 21, n. 3, p. 497 - 506, 1990.
- DRUART, N., DE ROOVER, J. VAN DEN ENDE, W., GOUPIL, P., VAN LAERE, A., RAMBOUR, S. Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Cichorium intybus* L.) plants. Villeneuve Dascq, França, e Heverlee, Bélgica, **Planta**, v. 212, n. 3, p[. 436 – 443, 2001.

- D'SOUZA, S.F., MELO, J. S. Immobilization of bakers yeast on jute fabric through adhesion using polyethylenimine: application in an annular column reactor for the inversion of sucrose. Mumbai, Índia, **Process Biochemistry**, v. 36, p. 677 – 681, 2001.
- EDELMAN, J., JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus* L. Irvine, EUA, **New Physiologist**, v. 116, p. 197 – 208, 1968.
- FARINE, S., VERSLUIS, C., BONNICI, P. J., HECK, A., PESCHET, J. L., PUIGSERVER, V., BIGINI, A. Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Marseille, França, e Utrech, Holanda, **Journal of Chromatography A**, v. 920, n. 1- 2, p. 299 – 308, 2001.
- GUEMAS, Y., BOUJTITA, M., EL MURR, N. Biosensor for determination of glucose in fruit juices by flow injection analysis. Nantes, França, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, n. 2 – 3, p. 171 – 181, 2000.
- GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Luhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.
- HENSON, C. A. , LIVINGSTON III, D. P. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolases multiple fructofuranosidic linkages. Madison e Raleigh, Estados Unidos, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 715 – 720, 1998.

- ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; GUTIERREZ, M. I. SAMPIETRO, A. R. Acid invertase from *Tropaelum* leaves. Tucumán, Argentina, **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 1993 -1998, 1988.
- KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.
- KIZILYAR, N., AKBULUT, U., TOPPARE, L., ÖZDEN, M. Y., YAGCI, Y. Immobilization of invertase in conducting polypyrrole / polytetrahydrofuran graft polymer matrices. Ankara e Istanbul, Turquia, **Synthetic Metals**, v. 104, p. 45 – 50, 1999.
- KOOPS, A. J., JONKER, H. H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Heliantus tuberosus* Colombia. Wageningen, Holanda, **Plant Physiology**, v. 110, p. 1167 – 1175, 1996.
- MARX, S. P., NÖSBERGER, J., FREHNER, M. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Zurich, Suíça, **New Phytologist**, v. 135, p. 267 – 277, 1997.
- MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; SUGAWARA, S. The occurrence and properties of alkaline invertase in mature roots of sugar beets. Hokkaido, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2309 - 2314, 1987.
- MUKHERJEE, K., SENGUPTA, S. Purification and properties of a nonspecific β -fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus*. Calcutta, Índia, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 520 - 524, 1987.

- PAVLINOVA, O. A., BALAKHONTSEV, E. N., PRASOLOVA, M. F., TURKINA, M. V. Sucrose-phosphate syntase, sucrose synthase, and invertase in sugar beet leaves. Moscow, Rússia, **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 49, n. 1, p. 68 – 73, 2002.
- RANWALA, A. P.; IWANAMI, S. S.; MASUDA, H. Acid and neutral invertases in the mesocarp of developing muskmelon (*Cucumis melon* L. cv Prince) fruit. Hokkaido, Japão, **Plant Physiology**, v. 96, p. 8812 - 886, 1991.
- RODRIGUEZ, J. A., AGUILAR, C. F., PADILLA, A. P. Enzyme preparation with invertase from yeast cell lysate using tangential flow filtration. San Luis, Argentina, **Desalination**, v. 130, n. 2, p. 131 - 136, 2000.
- ROSA, A. H., VICENTE, A. A., ROCHA, J. C., TREVISAN, H. C. A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. Araraquara, Brasil, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, n. 7, p. 730 – 733, 2000.
- RUTHERFORD, P. P., DEACON, A. C. β -fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Bath, Reino Unido, **Biochemical Journal**, v.126, p. 569 - 573, 1972.
- SCHAFFER, A. A. Invertases in young and mature leaves of *Citrus sinensis*. Rehovot, Israel, **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2275 - 2277, 1986.
- SINGH, M. B., KNOX, B. Invertases of *Lilium* pollen - characterization and activity during *in vitro* germination. Pakville, Austrália, **Plant Physiology**, v. 74, p. 510 - 515, 1984.
- TANASE, K., YAMAKI, S. Sucrose synthase isozymes related to sucrose accumulation during fruit development of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai).

Nagoya, Japão, **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 69, n. 6, p. 671 – 676, 2000.

UNGER, C.; HOFSTEEGE, J.; STURM, A. Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Dacota carota*. Basel, Suíça, **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 915 - 921, 1992.

VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.

VORSTER, D. J., BOTHA, F. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. Natal, África do Sul, **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 651 – 655, 1998.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625 p.

CAPÍTULO 4: COMPORTAMENTO PÓS COLHEITA DE RAÍZES DE YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*) COM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE INVERTASES

Resumo

Raízes de Yacon (*Smallanthus sonchifolia*) foram colhidas e armazenadas por até 25 dias a temperatura ambiente e em geladeira. Foram acompanhados o conteúdo de carboidratos e a atividade enzimática de invertases das raízes a cada 5 dias. A atividade enzimática variou bastante durante os diferentes armazenamentos, sendo a atividade máxima obtida após 15 dias de armazenamento em geladeira. As concentrações dos açúcares variaram bastante. As maiores concentrações detectadas, em ambas as temperaturas testadas, foram de frutose e 1-kestose. As concentrações dos açúcares como um todo aumentaram durante os diferentes armazenamentos. As maiores mudanças em termos de carboidratos se deram com frutose e 1-kestose.

Summary

Yacon roots (*Smallanthus sonchifolia*) were harvested and stored for up to 25 days at room temperature and at 4°C. The sugar content and enzymatic activity of the root invertases were determined every 5 days. The greatest changes in sugar content occurred for fructose and 1-kestose. The enzymatic activity varied with time under the different storage conditions, the maximum activity being found after 15 days at 4°C storage. The concentrations of the sugars varied greatly. The highest concentrations, were for fructose and 1-kestose at both temperature tested. The sugar concentrations increased during storage at both temperatures.

Introdução

Yacon é uma planta nativa dos Andes que possui grandes raízes tuberosas, com elevada quantidade de oligofrutanas (KURODA, et al., 1995). É uma espécie de *Smallanthus sonchifolia*, a mais importante economicamente entre o gênero das Asteraceae (ZARDINI, 1991, GRAU e REA, 1997). O yacon é rico em proteína bruta, K_2O e P_2O_5 . Pesa entre 200 e 500g, podendo chegar a 2 kg. Sua composição é similar à da alcachofra (HOLA e MICHL, 1996). Seu valor nutricional é baixo, e consiste basicamente de carboidratos. As raízes frescas possuem de 69 a 83% de umidade, 0,4 a 2,2% de proteínas e 20% de açúcares (VIETMEYER, 1989). Os bulbos das raízes contêm, em termos de porcentagem (%): cinzas 3,59; proteína 6,02; gordura 1,32; fibra bruta 3,88; nitrogênio livre extraível 85,19; K_2O 1,76; CaO 0,18; MgO 0,13; P_2O_5 0,31. Também contém inulina, altas concentrações de mono e dissacarídeos (cerca de 35% de frutose e 58% de glicose + sacarose), e polissacarídeos com baixo grau de polimerização (HOLA e MICHL, 1996). Estudos realizados por KURODA (1995) visando selecionar plantas com alta concentração de açúcares totais, conseguiram selecionar plantas de yacon com concentrações acima de 72%.

A sacarose está presente no yacon em forma transportável ou livre, como na maioria das plantas superiores. Ela é clivada tanto por invertases quanto por sacarose sintases (GUPTA et al., 1991). O metabolismo das plantas superiores em si implica na existência de pelo menos duas diferentes invertases em seus tecidos (CHENG et al., 1990). Invertases (β -d-frutofuranosidases) têm um papel chave no metabolismo de sacarose destas plantas. A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose em ligação β , 2-1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosidases presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992).

Este trabalho visou estudar o comportamento dos principais açúcares presentes no yacon após sua colheita, em diferentes condições de armazenamento. Visou também correlacionar este comportamento às enzimas do

tipo invertase, inerentes ao metabolismo de frutanas de plantas que armazenam estes tipos de carboidratos.

Material e Métodos

O yacon foi adquirido diretamente de um produtor selecionado no Ceasa de Campinas. O yacon foi plantado na cidade de Piedade, no Estado de São Paulo. O produto foi coletado fresco (no máximo 48 horas após a colheita). O yacon foi separado em lotes e armazenado por 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias a temperatura ambiente e em geladeira (4° C).

Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático de invertases do yacon foi preparado segundo SHIOMI et al. (1979), com adaptações. Todas as etapas de extração foram realizadas a temperatura baixa, próxima de 4°C. As raízes foram lavadas em água corrente, descascadas e cortadas em pequenos pedaços. Os pedaços foram homogenizados em liquidificador em tampão citrato fosfato em pH 5,5 a 0,05M, numa proporção de 1:1 (P/V). A homogeneização foi feita por pulsos de 2 segundos cada, cerca de 15 vezes. O homogenato foi filtrado em lã de vidro e então centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 5° C. As enzimas foram precipitadas com sulfato de amônio 80% por uma noite. O precipitado foi centrifugado, diluído em pequeno volume, e dialisado contra o mesmo tampão da extração, em concentração 0,01M. A amostra dialisada foi usada como extrato enzimático.

Atividade enzimática:

A reação para atividade enzimática ocorreu a 40°C por 2 horas em pH 5,5, utilizando sacarose como substrato numa concentração final de 10% com relação ao volume final da reação. O produto da hidrólise foi medido pelo método de

Somogy-Nelson (1944), com glicose como padrão. A proporção enzima: substrato foi de 1:10.

Os produtos das reações enzimáticas foram analisados também em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi utilizada coluna YMC- Pack Poliamine, eluição com acetonitrila: água (75: 25, v/v), fluxo de 1 mL/min, e detector de índice de refração. Foram utilizados padrões de glicose, frutose, sacarose, 1-kestose, nistose e neokestose (GF₂, GF₃ e GF₄, respectivamente). Os açúcares foram identificados de acordo com os respectivos tempos de retenção, e quantificados de acordo com as curvas de calibração dos padrões.

Extração dos açúcares

A extração dos açúcares do yacon foi feita segundo UCHIYAMA et al. (1985), com adaptações. O yacon foi lavado e descascado. Foram pesados 50g de yacon picados em fatias finas, e seus açúcares extraídos em 250mL de etanol 80%, a 90° C por 2 horas. Este material foi resfriado e filtrado. O etanol restante foi evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador (40° C) até formar um xarope. Cada xarope obtido foi diluído em água destilada para 35mL.

Análise dos açúcares

Os extratos de açúcares foram analisados quanto a qualidade e quantidade de açúcares presentes. Para tanto foi utilizado HPLC, nas mesmas condições e com os mesmos padrões utilizados na análise dos produtos das reações enzimáticas.

Resultados e discussão

Atividade enzimática

O comportamento da atividade enzimática durante o armazenamento do yacon pode ser acompanhado nas figuras 4.1 e 4.2, junto com os seus respectivos produtos de reação.

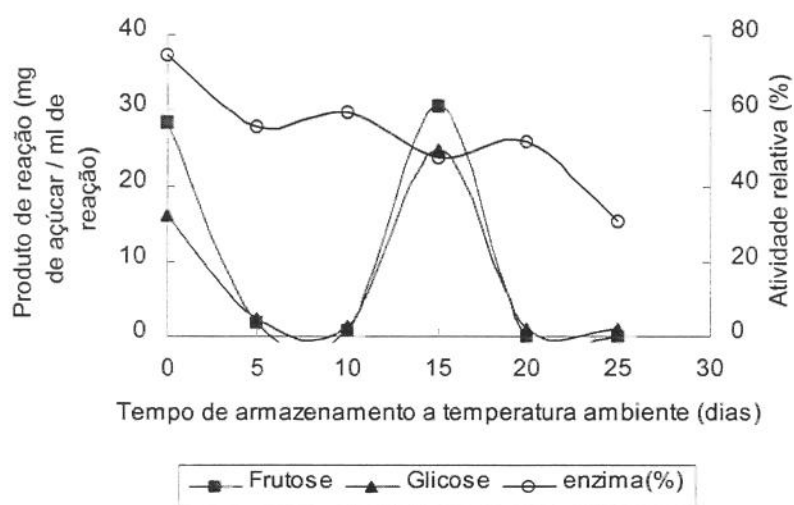


Figura 4.1: Atividade enzimática do extrato de yacon e produtos de reação (frutose e glicose) após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento a temperatura ambiente.

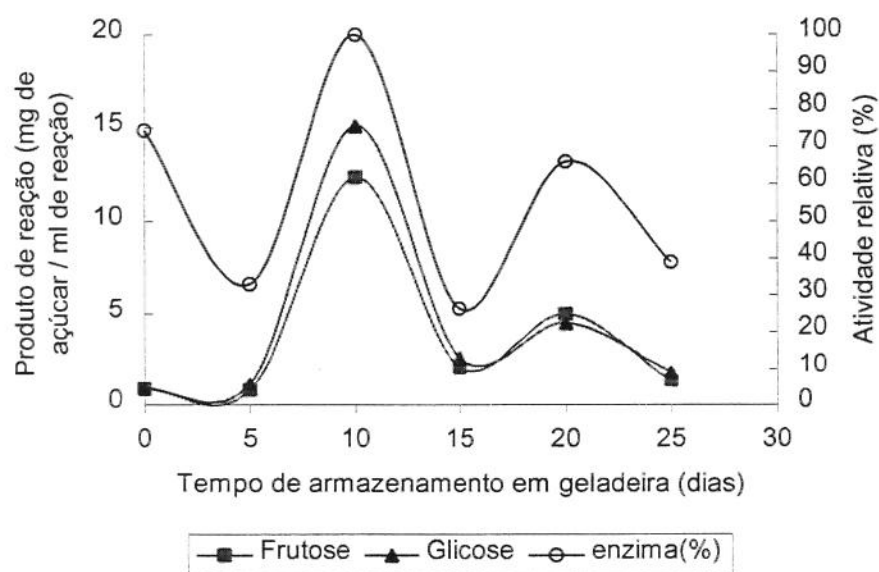


Figura 4.2: Atividade enzimática do extrato de yacon e produtos de reação (frutose e glicose) após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento em geladeira.

Para o armazenamento a temperatura ambiente, a atividade enzimática teve um declínio suave de acordo com o tempo de armazenamento. Ao final do período total de 25 dias, a enzima manteve cerca de 40% de sua atividade inicial.

O armazenamento em geladeira promoveu uma queda de 55% da atividade inicial após 5 dias de armazenamento, mas após 10 dias houve um aumento de 34% da atividade inicial. Após 15 e 20 dias de armazenamento ocorreu novamente o mesmo comportamento de queda (15 dias) e aumento (20 dias) de atividade enzimática. Os produtos de reação em termos de mg/mL de reação (glicose e frutose) seguem basicamente os mesmos perfis das enzimas em diferentes condições de armazenamento. A única exceção foi a atividade do extrato enzimático do yacon armazenado a temperatura ambiente após 15 dias, que resultou em atividade (por Somogy-Nelson) inferior à quantidade de açúcares detectada por HPLC.

Análise dos açúcares

O perfil dos açúcares do yacon durante o período de armazenamento, em temperatura ambiente e em geladeira, pode ser acompanhado nas figuras 4.3 e 4.4 respectivamente.

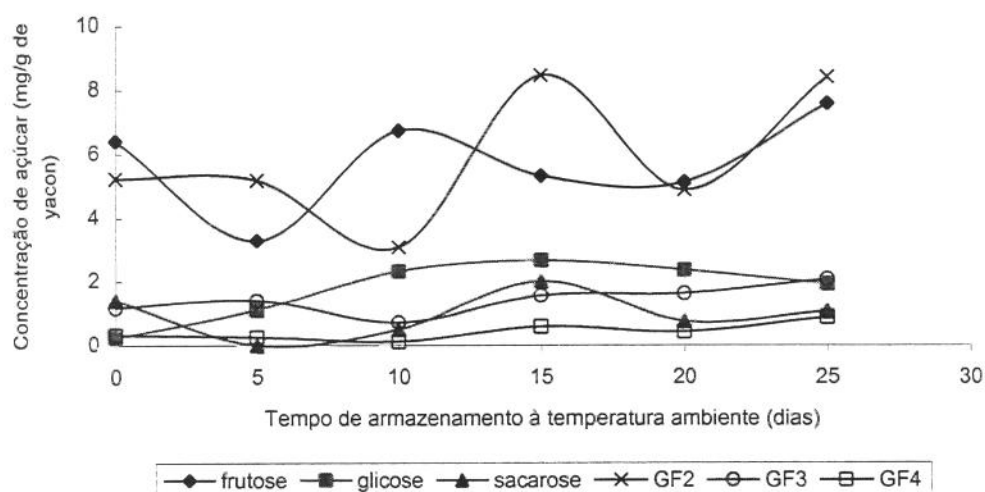


Figura 4.3: Mudanças na quantidade dos açúcares frutose, glicose, sacarose, 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e neokestose (GF₄) durante o armazenamento de yacon a temperatura ambiente após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias.

Durante o armazenamento a temperatura ambiente as maiores mudanças ocorreram nas concentrações de frutose e GF₂. No entanto, o aumento da concentração de GF₂ coincide com a diminuição da concentração de frutose, e vice versa, na mesma amostra. O pico máximo de concentração de GF₂ se deu após 15 dias de armazenamento, com 8,5 mg.g⁻¹ de yacon. A concentração de frutose variou de 3,3 a 7,6 mg.g⁻¹ de yacon, e a de GF₂ variou de 3 a 8,5 mg.g⁻¹ de yacon.

A concentração de glicose aumentou gradativamente durante o período de armazenamento, variando de 0,3 e 2,7 mg.g⁻¹ de yacon, com pico máximo também após 15 dias de armazenamento. Os níveis de sacarose, glicose, GF₃ e GF₄ variaram pouco ao longo do armazenamento a temperatura ambiente, entre 0 e 2,1 mg.g⁻¹ de yacon. Para todos os açúcares analisados o pico máximo de concentração ocorreu após 15 dias de armazenamento.

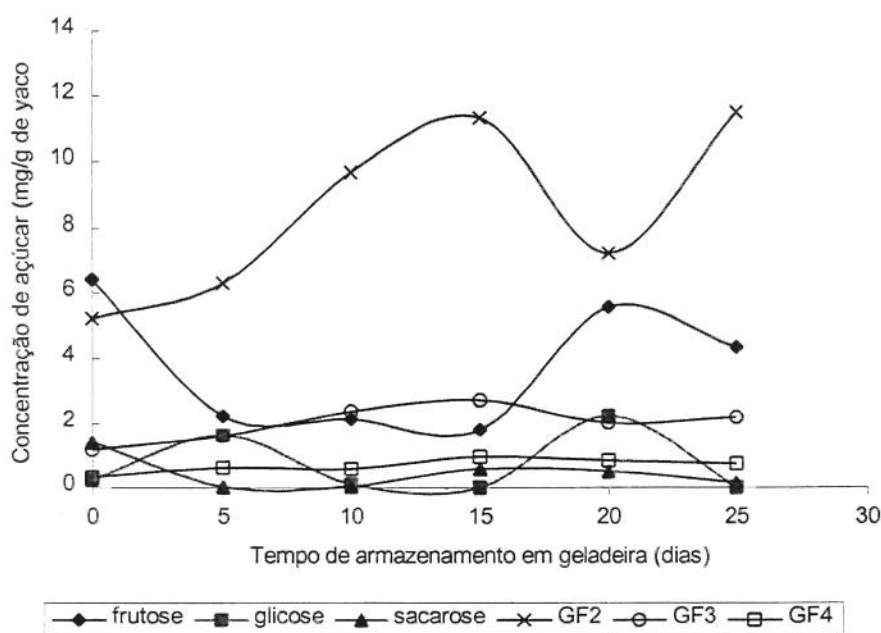


Figura 4.4: Mudanças na quantidade dos açúcares frutose, glicose, sacarose, 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e neokestose (GF₄) durante o armazenamento de yacon em geladeira após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias.

Assim como aconteceu com o armazenamento a temperatura ambiente, as maiores mudanças de concentração de açúcar aconteceram com GF₂ e frutose durante o armazenamento em geladeira. O aumento da concentração de GF₂ coincide com a diminuição da concentração de frutose, e vice versa, na mesma amostra. O pico máximo de concentração de GF₂ ocorreu após 15 dias de armazenamento, com 11,5 mg.g⁻¹ de yacon. Esta concentração é 35% mais alta que a atingida a temperatura ambiente. A concentração de frutose variou de 1,8 a 6,4 mg.g⁻¹ de yacon, e a de GF₂ variou de 5,2 a 11,5 mg.g⁻¹ de yacon.

A concentração de glicose variou na mesma proporção da de frutose entre 10 e 25 dias de armazenamento. Tanto para frutose quanto para glicose o pico máximo de concentração foi verificado após 20 dias de armazenamento em geladeira, diferente do armazenamento a temperatura ambiente. Os níveis de sacarose, glicose e GF₄ permaneceram praticamente constantes ao longo do armazenamento a temperatura ambiente, também entre 0 e 1,4 mg.g⁻¹ de yacon. A concentração de GF₃ teve valor máximo após 15 dias de armazenamento, assim

como a de GF₂. Além disso, as concentrações de GF₃ variaram entre 1,2 e 2,7 mg.g⁻¹ de yacon, valores maiores que os obtidos ao longo do armazenamento a temperatura ambiente.

Os açúcares que estão em maior concentração no yacon em todas e as etapas testadas foram a frutose e 1-kestose (GF₂).

No armazenamento a temperatura ambiente as maiores concentrações dos açúcares coincidem com os picos de maior atividade das enzimas isoladas. Há indicação da presença de invertase, que hidrolisa sacarose em frutose e glicose. No entanto estão também presentes no yacon outras enzimas do metabolismo da sacarose, uma vez que a concentração de sacarose também é alta (provavelmente devido a uma enzima sacarose sintase). Principalmente a alta concentração de GF₂ leva a conclusão da presença de frutose transferase nos tecidos das raízes do yacon.

No armazenamento a 4°C (geladeira), a atividade máxima das enzimas isoladas foi observada em dois picos, após 10 e 20 dias de armazenamento. O pico máximo da presença de frutose e glicose no yacon foi após 20 dias de armazenamento.

As respostas de plantas ao armazenamento têm sido estudadas. WEI et al. (1995) estudaram o efeito do armazenamento sobre oligossacarídeos do yacon, e mostraram que as concentrações de glicose e frutose aumentaram, enquanto a dos demais oligossacarídeos diminuíram, diferentemente dos resultados aqui obtidos. Aqui a concentração que mais aumentou foi GF₂, um oligossacarídeo. Os açúcares como um todo tiveram aumento de concentração nas condições e período estudados.

Segundo VAN den ENDE e VAN LAERE (1996), o armazenamento a baixas temperaturas resulta em rápida despolimerização de frutanas de cadeia longa com um aumento simultâneo de frutose, sacarose e glicose em *Heliantus tuberosus*. CLAESSENS (1993) concluiu que o armazenamento de *Cichorium intybus* a 1° C aumenta a concentração de frutose, mas após um longo período de tempo há a indução da quebra desta mesma frutose. O que se supõe é que o metabolismo de frutanas funciona de forma protetora contra o frio (VAN den ENDE

e VAN LAERE, 1996). Alcachofras, que são fonte de inulina, armazenadas a baixas temperaturas possuem frutanas de baixo peso molecular (frutooligossacarídeos), ao contrário de quando são colhidas, quando possuem frutanas de alto peso molecular (GALINDO e GUIRARD, 1997).

A atividade de invertases e a concentração de açúcares redutores de batata doce mantida a baixas temperaturas aumenta significativamente, segundo HUANG et al. (1999). Isto aconteceu especificamente com invertases ácidas. O conteúdo de açúcares redutores está intimamente relacionado com a atividade de invertases, para batata doce.

O armazenamento de batatas (*Solanum tuberosum*) a baixa temperatura (6° C) levou a um aumento da atividade de invertase. As raízes frescas continham baixas concentrações de açúcares redutores e de atividade de invertase. O armazenamento a 20° C levou a um declínio tanto na atividade de invertases quanto na concentração de açúcares redutores (PESHIN, 2000).

A proporção relativa de oligofrutanas e monossacarídeos flutua significativamente durante o ciclo de crescimento e depois da colheita, levando a resultados aparentemente contraditórios. Por exemplo, um estudo detalhado dos açúcares do yacon publicado por OHYAMA et al. (1990) indicou que oligofrutanas são apenas 20% dos seus açúcares, contra 67% reportados por ASAMI et al. (1991). É importante ressaltar que o primeiro trabalho usou material que estava estocado a baixa temperatura por mais de 3 meses, enquanto o segundo utilizou raízes recém colhidas.

Estudo semelhante ao presente foi realizado por CISNEROS- ZEVALLOS et al. (2002), com yacon originário do Peru. Os autores constataram grande variabilidade no conteúdo de frutooligossacarídeos (FOS), além de uma relação inversa entre o conteúdo desses com o de açúcares redutores. O maior decréscimo de FOS foi observado após 15 dias a temperatura ambiente, com quedas de até 46%, junto com um acréscimo de açúcares redutores. À temperatura de 4° C (geladeira) também se detectou uma ligeira queda de FOS após 15 dias de armazenamento.

Resultados de análises de carboidratos feitas por GOTO et al. (1995) sugerem que os oligossacarídeos do yacon possuem ligação β -D-frutofuranosil (2-1), repetindo unidades com terminal sacarose e, portanto, oligossacarídeos tipo inulina. Estes resultados coincidem com os resultados obtidos, onde foram encontradas altas concentrações de frutooligossacarídeos, principalmente GF₂.

Os níveis de sacarose e frutose em raízes de chicória permanecem os mesmos durante a época de crescimento, enquanto os níveis de carboidratos totais não estruturais e de frutanas aumentam. Em épocas em que a temperatura cai, e especialmente durante a fase de armazenamento, há aumento de sacarose e frutose; ao mesmo tempo, frutanas que não possuem glicose e com baixo grau de polimerização, e carboidratos totais não estruturais diminuem (ERNEST et al., 1995).

Conclusões

A concentração dos diferentes açúcares do yacon varia muito durante o armazenamento, tanto a 4°C (geladeira) quanto a temperatura ambiente.

Os açúcares que estão presentes em maior concentração, nas condições testadas, são a frutose e 1-kestose. A concentração dos açúcares aumenta após 25 dias de armazenamento.

A atividade das enzimas do tipo invertase do yacon são influenciadas pelo armazenamento. A maior atividade de invertase foi detectada em yacon armazenado em geladeira, após 15 dias de armazenamento.

Não é possível relacionar as mudanças dos açúcares somente com a atividade de invertase do yacon. Há necessidade de se investigar outras enzimas do metabolismo de frutanas para fazer uma correlação entre as enzimas e as concentrações de açúcares.

Há diferenças entre dados de vários trabalhos a respeito dos açúcares do yacon. Deve-se levar em conta as diferenças climáticas e de relevo dos locais de cultivo das diferentes plantas usadas nos trabalhos.

Referências Bibliográficas

- ASAMI, T., MINAMISAWA, K., TSUKIHASHI, T., et al. Fluctuations of oligofructan contents in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. Ibaraki, Japão. **Japanese Journal of Soil Science Plant Nutrition**, v. 62, p. 621 – 627, 1991.
- CHENG, J. F.; MITSUYA, N.; JUANG, R. H.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of invertase isosymes from bamboo shoots. Taipei, Tailândia, **Biochemistry International**, v. 21, n. 3, p. 497 - 506, 1990.
- CISNEROS-ZEVALLOS, L., NÚÑEZ, R., CAMPOS, D., et al. Characterization and evaluation of fructooligosaccharides on Yacon roots (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. & End) during storage. Disponível em: http://ift.confex/2002/technoprogram/paper_14450.htm.. Acesso em: 22 de maio de 2002.
- CLAESSENS, G.; LAER, A. V.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus*). Heverlee, Bélgica **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 35 - 39, 1990.
- ERNEST, M.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A. Carbohydrate changes in chicory (*Cichorium intybus* L var Foliosum) during growth and storage. Surrey, Inglaterra, **Scientia Horticulturae** v. 63, n.3 – 4, p.251 – 261, 1995.
- GALINDO, S.S., GUIRAUD, J. P. Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. Montpellier, França, **Bioresource Technology**, v. 60, p. 15 – 20, 1997.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Shizuoka, Japão,

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v.59, n.12, p. 2346 – 2347, 1995.

GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M., e Heller, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahupa, arracha, maca, yacon**: Promoting the conservation and use of understanding and neglected crops. Gater Slaben, Institute of plant genetics and crop plant research, 1997. Capítulo 21, pp. 199 – 241. Disponível em: <http://www.cipotato.org/market/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 20 de maio de 2002.

GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Ludhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.

HOLA, Z.; MICHL, J. (Yacon (*Polymnia sonchifolia*), a non tradicional source of fructose). *Listy Cukorvarnické a Reparské*. Praga, República Checa, **Journal of Fruits Vegetables and Nuts**, v.110, n.7, p.194 - 196, 1996.

HUANG, Y. H., PICHA, D. H., KILILI, A. W., JOHNSON, C. E. Changes in invertase activities and reducing sugar content in sweet potato stored at different temperatures. Baton Rouge, EUA, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 12, p. 4927 – 4931, 1999.

KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.

KURODA, S., ISHIRARA, J. Field growth characteristics of plantlets propagated *in vitro* and line selection for increased percentage of sugar in tuberous root of

yacon, *Polymnia sonchifolia*. Kioto, Japão, **Bulletin of the Shikoku National Agricultural Experiment Station**, v.57, p.111 - 121, 1995.

NELSON, N. A Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 379 –380, 1944.

OHYAMA, T., ITO, O., YASUYOSHI, S., et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Tsukuba / Ibaraki, Japão, **Soil Science and Plant Nutrition**, v.36, n.1, p.167 – 171, 1990.

PESHIN, A. Influence of storage temperature on invertase activity and sugar content in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Shimla, Índia. **Indian Journal of Plant Physiology**. v. 5, n. 3, p. 297 – 299, 2000.

SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by Asparagus fructosyltransferases. Tokio, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.43, n.11, p.2233 -2244, 1979.

UCHIYAMA, T., YONEDA, I., MURAKAMI, Y., et al. Identification of fructo-oligosaccharides from the bulbs of *Lycoris radiata* Herbert. Osaka, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.11, p.3315 – 3317, 1985.

VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.

VIETMEYER, N. D. (Edited by) - National Research Council. **Lost crops of the Incas little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation**. Washington Academy Press, 415p., 1989.

WEI, B.; HARA, M.; YAMAUCHI, R.; UENO, Y.; KATO, K. (Fructooligosaccharides in the tubers of Jerusalem artichoke and Yacon). Hokkaido, Japão, **Research Bulletin of the Faculty of Agriculture**, v. 56, p.133 - 138, 1992.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on "Yacon" *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). St. Louis, Estados Unidos, **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72 – 75, 1991.

CAPÍTULO 5: EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*)

Resumo

Enzimas do tipo β -frutofuranosidase foram extraídas de yacon (*Smallanthus sonchifolia*). A otimização da extração foi realizada utilizando diferentes tampões, com diferentes valores de pH, e com diferentes tipos de fracionamento de proteínas. As β -frutofuranosidasas do extrato enzimático apresentaram atividade ótima em pH 5,5 e a 40° C, e valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para o substrato sacarose iguais a 0,0258M e 0,1265 μ mol/mL/min, respectivamente. O extrato apresentou atividade de invertase detectada por açúcares redutores resultantes da reação enzimática. As enzimas apresentaram estabilidade a valores de pH entre 5,0 e 5,5, e estabilidade à temperatura entre 30° C e 40° C.

Summary

β -frutofuranosidase enzymes were extracted from yacon (*Smallanthus sonchifolia*). The optimization of the extraction was carried out using different buffers, different pH values and different types of protein precipitation. The enzyme extract was characterized biochemically: pH optimum of 5.5, optimum temperature of 40° C and the following kinetic parameters: K_m = 0,0258M and V_{max} = 0,1265 μ mol/mL/min. The extract presented invertase activity detected by reducing sugar production. The enzyme is stable between pH 5.0 to 5.5 and at temperatures between 30° C and 40° C.

Introdução

O yacon (*Smallanthus sonchifolia*) (GRAU e REA, 1997) é uma planta nativa dos Andes que possui grandes raízes tuberosas, com elevada quantidade de oligofrutas (KURODA e ISHIRARA, 1995). É a mais importante

economicamente entre a família das Asteraceae (ZARDINI, 1991). -A planta cresce rápido e facilmente, atingindo a maturidade em 6 ou 7 meses, e sobrevive até mesmo em solos pobres. Seu valor nutricional é baixo, e consiste basicamente de carboidratos. As raízes frescas possuem de 69 a 83% de umidade; 0,4 a 2,2% de proteínas e 20% de açúcares (VIETMEYER, 1989).

A sacarose está presente no yacon em forma transportável ou livre, como na maioria das plantas superiores, e é clivada tanto por invertases quanto por sacarose sintases (GUPTA et al., 1991). A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose em ligação β , 2-1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosidases presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992). β -d-frutofuranosidases têm um papel chave no metabolismo de sacarose de plantas superiores. No citosol a sacarose pode ser hidrolisada por uma invertase neutra ou uma sacarose sintase, gerando hexoses fosfato como substrato para a respiração, para síntese de polissacarídeos estruturais, e possível formação de amido. Por outro lado, a sacarose pode ser transportada para o vacúolo, onde é armazenada como tal ou polimerizada em frutanas, como inulina em Asteraceae, ou em cadeias mais complexas de frutanas, como ocorre em outras plantas (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995). A função fisiológica das diversas invertases é difícil de compreender totalmente, mas é possível que várias isoenzimas de invertase sejam ativas em diferentes microambientes, que variem em grau de acidez (GUPTA et al., 1991).

Material e métodos

O yacon foi adquirido diretamente de um produtor selecionado no Ceasa de Campinas. O yacon foi plantado na cidade de Piedade, no Estado de São Paulo. O produto foi coletado fresco (no máximo 48 horas após a colheita).

Para as etapas de caracterização bioquímica do extrato enzimático foram utilizadas plantas da mesma época. Para isso, grande quantidade de uma mesma partida (colheita) de yacon teve o extrato bruto enzimático extraído de uma só

vez. Esse extrato bruto foi congelado em pequenas quantidades (cerca de 350 mL), somente sendo descongelado imediatamente antes de sua utilização.

Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático do yacon foi preparado segundo SHIOMI et al. (1979), com adaptações. Todas as etapas de extração foram realizadas a temperatura baixa, próxima de 4°C. As raízes foram lavadas em água corrente, descascadas e cortadas em pequenos pedaços. Os pedaços foram homogenizados em liquidificador em tampão citrato fosfato com valores de pH entre 5,0 e 7,0 a 0,05M, ou água destilada numa proporção de 1:1 (P/V). A homogenização foi feita por pulsos de 2 segundos cada, cerca de 15 vezes. O homogenato foi filtrado em lã de vidro e então centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 5° C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi chamado "extrato bruto".

Fracionamento de proteínas

O extrato bruto foi usado para testar diferentes condições de fracionamento das proteínas. Foram testados os reagentes: sulfato de amônio, variando a concentração entre 30 e 90%; acetona, numa proporção 1:2, variando o tempo de ação (10 minutos, 3,5 horas e 24 horas); etanol, numa proporção 3:7, por uma noite. Os precipitados obtidos com sulfato de amônio foram dialisados contra tampão citrato fosfato pH 5,5, 0,05M. Os precipitados obtidos com os solventes orgânicos (etanol e acetona) foram espalhados em placas de vidro para evaporação dos solventes, então raspados e recolhidos em forma de pó.

Caracterização bioquímica do extrato enzimático

O extrato enzimático de yacon (EEY) foi caracterizado bioquimicamente quanto a pH e temperatura ótimos de atuação, pH e temperatura de estabilidade e parâmetros cinéticos:

- Efeito do pH na atividade enzimática: a atividade do extrato enzimático foi medido em diferentes tampões: citrato fosfato para valores de pH entre 3,0 e 5,5; fosfato para valores de pH entre 6,0 e 8,0; borato para pH 9.
- Efeito da temperatura na atividade enzimática: do mesmo modo foi realizado para temperatura, com variações entre 20°C e 70°C, com variações de 5° em 5° C.
- Efeito da concentração de substrato: foi medido para substrato sacarose, utilizando-se o gráfico de Lineweaver – Burk para se obter Km e V máximo.
- Determinação de pH e temperatura de estabilidade. Para a determinação do pH de estabilidade, o EEY foi incubado por 24 horas em diferentes valores de pH, entre 4,0 e 9,0, seguido de medição de atividade a pH 5,5 a 40° C com 2 horas de reação. Para a determinação da temperatura de estabilidade o EEY foi incubado por 2 horas em diferentes temperaturas, entre 25° C e 70° C, em pH 5,5. A medida de atividade residual foi feita em pH 5,5 a 40° C com 2 horas de reação.

Atividade enzimática

A reação para atividade enzimática ocorreu a 40° C por 2 horas em pH 5,5, utilizando sacarose como substrato em concentração final de 10% com relação ao volume final da reação. O produto da hidrólise foi medido pelo método de Somogy-Nelson (1944) utilizando-se glicose como padrão. A proporção enzima: substrato foi de 1:10.

Uma unidade de invertase foi definida como a quantidade de extrato enzimático que catalisa a produção de 1 μ mol de açúcar redutor como glicose por minuto.

Resultados

Preparo do extrato enzimático e fracionamento de proteínas

Dos diferentes valores de pH testados na extração do EEY, o pH 5,5 foi o que apresentou melhor atividade para o extrato bruto. No entanto, a extração com água destilada apresentou um extrato bruto com atividade equivalente ao do tampão citrato fosfato a pH 5,5.

Os fracionamentos realizados com os solventes orgânicos etanol e acetona resultaram em precipitados sem atividade (Figura 5.1). O fracionamento com sulfato de amônio resultou, para todas as concentrações testadas, em precipitados com atividade de invertase, sendo que a maior atividade foi obtida com 60% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 5.2).

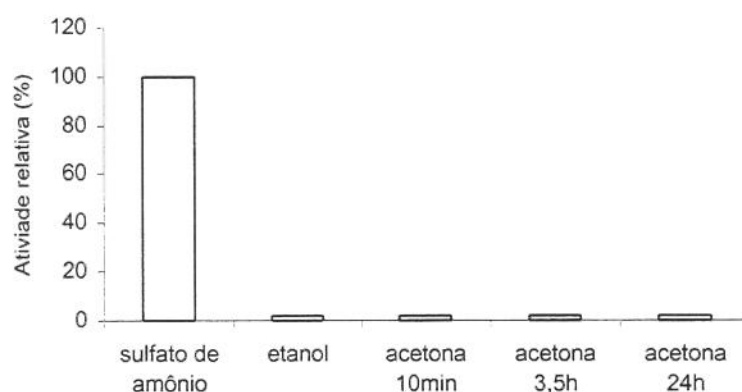


Figura 5.1: Comparação da recuperação de β -frutofuranosidase do extrato enzimático de yacon (EEY) usando sulfato de amônio e solventes orgânicos.

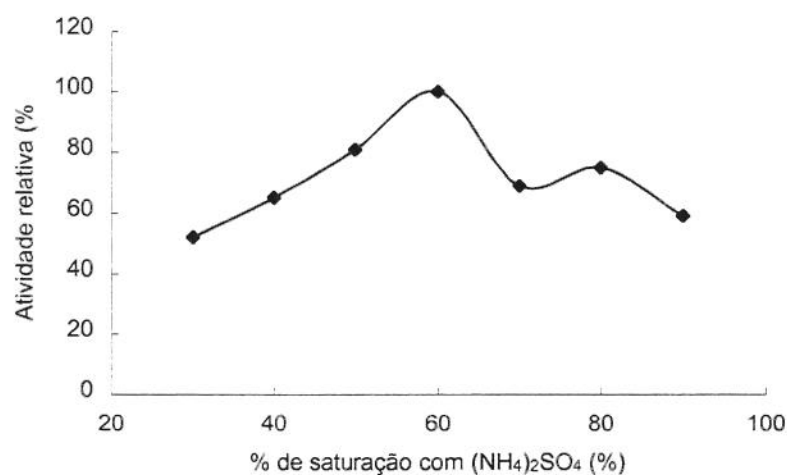


Figura 5.2: Obtenção de β -frutofuranosidase do extrato bruto de yacon usando diferentes concentrações de saturação com sulfato de amônio.

Caracterização bioquímica do extrato enzimático

O efeito do pH e da temperatura na atividade do EEY pode ser conferido nas figuras 5.3 e 5.4 respectivamente.

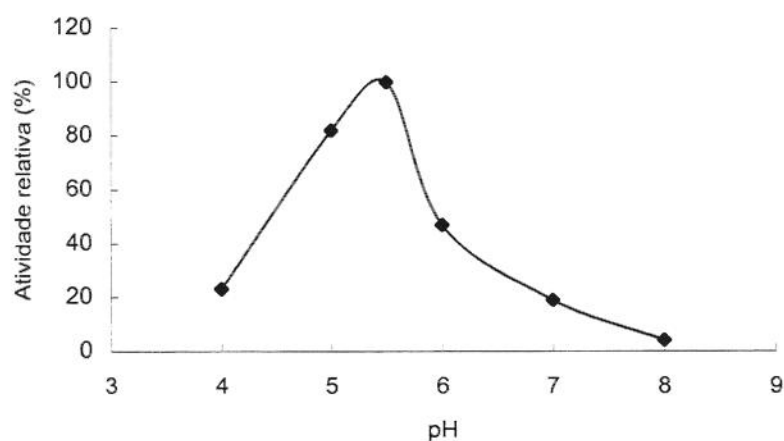


FIGURA 5.3: Efeito do pH na atividade enzimática do EEY, com substrato sacarose 10%, incubação por 2 h a 40°C.

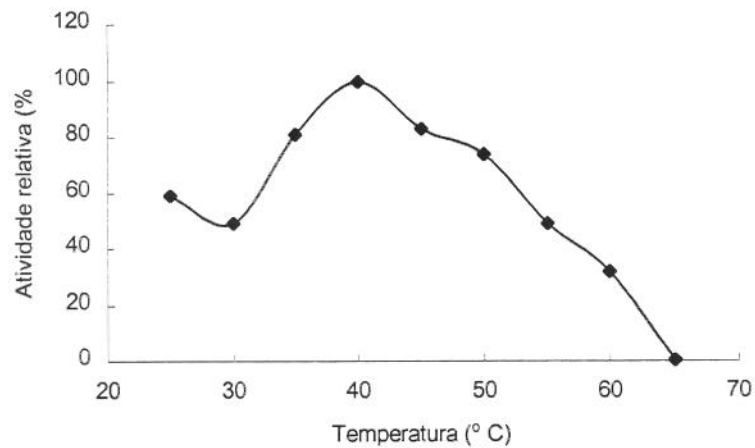


FIGURA 5.4: Efeito da temperatura na atividade enzimática do Eey, com substrato sacarose 10%, incubação por 2 h, em pH 5,5.

O pH e a temperatura de estabilidade do Eey podem ser conferidos nas figuras 5.5 e 5.6, respectivamente.

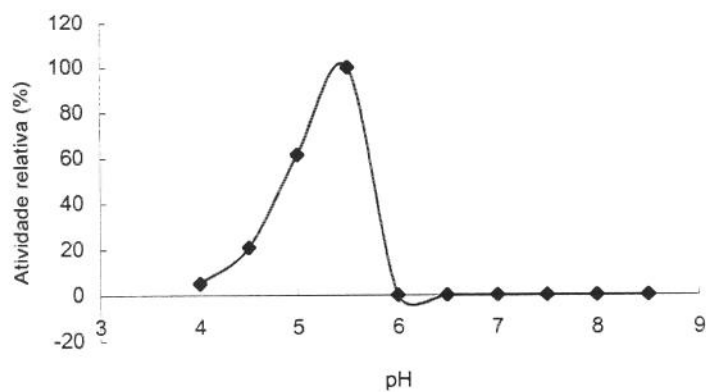


Figura 5.5: pH de estabilidade do Eey após incubação da enzima por 24 horas, seguida de medição da atividade a pH 5,5, a 40° C por 2 horas.

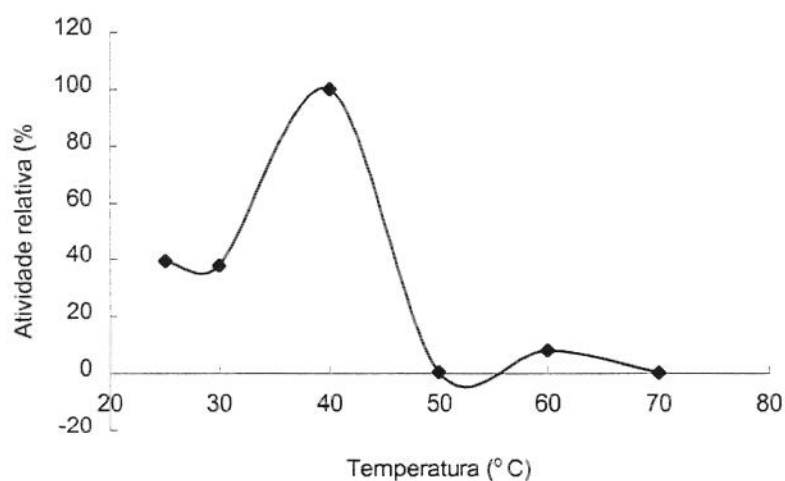


Figura 5.6: Temperatura de estabilidade do Eey após incubação por 2 horas a pH 5,5, seguida de medição da atividade a pH 5,5, a 40° C por 2 horas.

O efeito da concentração de substrato pode ser visualizado nas figuras 5.7 e 5.8.

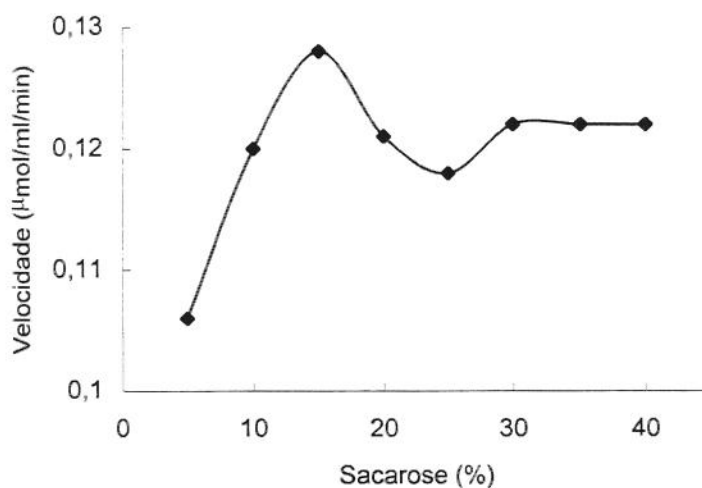


FIGURA 5.7: Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática do Eey, com incubação por 2 h a 40°C (M-M).

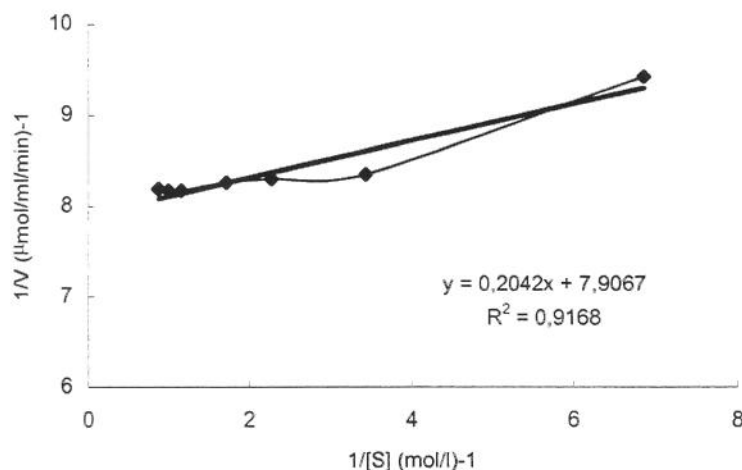


Figura 5.8: Determinação gráfica dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da invertase de yacon de acordo com Lineweaver-Burk. A regressão linear da curva é $y = 0,2042x + 7,9067$, com $r^2 = 0,9168$. Isto corresponde a um $K_m = 0,0258M$ e $V_{m\acute{a}x} = 0,1265\mu\text{mol/mL/min}$.

Discussão

Preparo do extrato enzimático e fracionamento de proteínas:

Os resultados demonstraram que a água destilada extrai as enzimas em questão com tanta eficiência ou mais que a extração com tampão citrato fosfato. Os trabalhos que fazem extração de enzimas vegetais, geralmente utilizam tampão além de outros agentes para proteger as enzimas contra os muitos e variados componentes das células vegetais. Por exemplo, RUTHERFORD e DEACON (1972) extraíram β -frutofuranosidases de raízes de dente de leão utilizando tampão citrato fosfato a pH 7,6, adicionado de cisteína e dietilditiocarbamato de sódio. ARAI et al. (1991) fizeram extração de invertase ácida de sementes de feijão com tampão contendo fosfato de sódio, EDTA e mercaptoetanol. SHIOMI et al. (1979) extraíram β -frutofuranosidases de aspargos utilizando tampão fosfato pH7,0. ISLA et al. (1988) extraíram invertase ácida de

folhas de *Tropaelum* com tampão fosfato de sódio contendo mercaptoetanol, NaCl e Na₂SO₃. No entanto, as enzimas do tipo β -frutofuranosidase do yacon não sofreram danos durante a extração, podendo-se utilizar água destilada.

Os extratos enzimáticos fracionados com os solventes etanol e acetona não apresentaram nenhuma atividade de invertase, provavelmente devido a desnaturação das enzimas. A precipitação com sulfato de amônio indicou que 60% de saturação é a concentração ideal para a precipitação das enzimas com atividade de invertase de yacon. Há relatos na literatura de trabalhos que usam precipitação com sulfato de amônio como primeira etapa de purificação deste tipo de proteínas. ISLA et al. (1988) utilizaram frações que precipitaram entre 30 e 90% na purificação de invertase ácida de folhas de *Tropaelum*. RUTHERFORD e DEACON (1972) precipitaram β -frutofuranosidases de raízes de dente de leão utilizando 95% de saturação de sulfato de amônio. VORSTER e BOTHA (1998) precipitaram invertases de cana de açúcar com 20 a 60% de saturação do sal.

Caracterização bioquímica do extrato enzimático

Para valores de pH 3,0 e 9,0 não se detectou nenhuma atividade enzimática no extrato enzimático de yacon. O pH em que a invertase do EEY apresentou maior atividade para as condições testadas foi o pH 5,5. Esse resultado coincide com o pH ótimo de enzimas isoladas de outros vegetais que são reservatórios de inulina e oligossacarídeos, que apresentaram pH ótimo igual a 5,0 para invertases de alcachofras (EDELMAN e JEFFORD, 1968) e de chicória (GUPTA et al., 1991, KAUR et al., 1992). Invertases de cogumelos também apresentaram pH ótimo igual a 5,0 (RANWALA et al., 1991) e 6,0 (MUKHERJEE e SENGUPTA, 1987).

A temperatura de incubação em que a invertase do EEY apresentou melhor atividade para as condições testadas foi de 40° C. A temperatura ótima de atividade para invertases varia bastante, desde 25° C (EDELMAN e JEFFORD, 1968) até 30° C (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995) para invertases de

alcachofra, e de 37° C (KAUR et al., 1992) a 45° C (GUPTA et al., 1991) para invertases de chicória.

A β -frutofuranosidase ou invertase do EEY apresentou cinética de Michaelis-Menten. Pelo gráfico de Lineweaver-Burk foi possível se determinar os parâmetros cinéticos $K_m=0,0258M$ e $V_{m\acute{a}x}=0,1265\mu\text{mol/mL/min}$ para o substrato sacarose.

A invertase do EEY apresentou maior estabilidade em pH 5,5 após 2 horas de tratamento a 40° C. Em pH 5,0 a enzima manteve 60% de atividade residual, e em valores de pH superiores a 6,0, após 2h a 40° C a enzima foi completamente inativada.

Quanto a estabilidade à temperatura, entre 25° e 30° C a invertase do EEY manteve cerca de 40% de atividade relativa, e a partir de 50° C a enzima foi inativada.

Conclusões

A melhor forma de extração das enzimas do tipo β -frutofuranosidases de yacon é com água destilada.

O extrato enzimático de yacon (EEY) mantém atividade máxima quando o fracionamento das proteínas é feito com sulfato de amônio a 60% de saturação.

O EEY possui atividade de invertase.

A invertase do EEY apresentou atividade ótima a pH 5,5 e a 40° C, e estabilidade na faixa de pH 5,0 a 5,5 e em temperaturas inferiores a 40° C.

Referências Bibliográficas

- ARAI, M.; MORI, H.; IMASEKI, H. Roles of sucrose metabolizing enzymes in growth of seedlings. Purification of acid invertase from growing hypocotyls of mung bean seedlings. Nagoya, Japão, **Plant and Cell Physiology**, v.32, n. 8, p. 1291 - 1298, 1991.
- EDELMAN, J., JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus* L. Irvine, EUA, **New Physiologist**, v. 116, p. 197 – 208, 1968.
- GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M., e Heller, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahipa, arracha, maca, yacon**: Promoting the conservation and use of understanding and neglected crops. Gater Slaben, Institute of plant genetics and crop plant research, 1997. Capítulo 21, pp. 199 – 241. Disponível em: <http://www.cipotato.org/market/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 20 de maio de 2002.
- GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Ludhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.
- ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; GUTIERREZ, M. I. SAMPIETRO, A. R. Acid invertase from *Tropaeolum* leaves. Tucumán, Argentina, **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 1993 -1998, 1988.
- KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.

- KURODA, S., ISHIRARA, J. Field growth characteristics of plantlets propagated *in vitro* and line selection for increased percentage of sugar in tuberous root of yacon, *Polymnia sonchifolia*. Kioto, Japão, **Bulletin of the Shikoku National Agricultural Experiment Station**, v.57, p.111 - 121, 1995.
- MUKHERJEE, K., SENGUPTA, S. Purification and properties of a nonspecific β -fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus*. Calcutta, Índia, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 520 - 524, 1987.
- NELSON, N. A Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 379 -380, 1944.
- RANWALA, A. P.; IWANAMI, S. S.; MASUDA, H. Acid and neutral invertases in the mesocarp of developing muskmelon (*Cucumis melon* L. cv Prince) fruit. Hokkaido, Japão, **Plant Physiology**, v. 96, p. 8812 - 886, 1991.
- RUTHERFORD, P. P., DEACON, A. C. β -fructofuranosidases from roots of Dandalion (*Taraxacum officinale* Weber). Bath, Reino Unido, **Biochemical Journal**, v.126, p. 569 - 573, 1972.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by Asparagus fructosyltransferases. Tokio, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.43, n.11, p.2233 -2244, 1979.
- VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.
- VIETMEYER, N. D. (Edited by) - National Research Council. **Lost crops of the Incas little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation**. Washington Academy Press, 415p., 1989.

VORSTER, D. J., BOTHA, F. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. Natal, África do Sul, **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 651 – 655, 1998.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on “Yacon” *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). St. Louis, Estados Unidos, **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72 – 75, 1991.

CAPÍTULO 6: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INVERTASE DE YACON (*SMALLANTHUS SONCHIFOLIA*) .

Resumo

O yacon é uma raiz andina, rica em oligofrutanas, e de fácil cultivo. Invertases de yacon foram extraídas, semipurificadas e caracterizadas. O perfil cromatográfico e SDS-PAGE indicam a presença de isoformas na fração final da purificação enzimática, bem como o seu comportamento com relação a temperatura e pH. O pH ótimo de atuação da invertase semipurificada é 5,5, e a temperatura ótima de atuação é 60° C. O peso molecular foi estimado em 68 KDa por SDS-PAGE e filtração em gel Sephacril –S200. A enzima apresentou maior estabilidade em pH 5,5, sendo inativada a pH superior a 6,0, e estabilidade a temperatura entre 35° C e 40° C.

Summary

Yacon is an Andean root rich in oligofrutans and easy to cultivate. Yacon invertases were extracted, semi purified and characterized. The chromatographic profile and SDS-PAGE indicated the presence of isoenzymes in the final fraction of the enzymatic purification, as did its behavior with respect to temperature and pH. The optimum pH for activity of the semipurified invertase was 5.5 and the optimum temperature was 60° C. The molecular weight was 68 KDa, determined by eletroforesis and gel filtration. The enzyme presents low pH stability, and is thermolabile, being stable only between 35° and 40° C.

Introdução

O yacon é do gênero *Smallanthus sonchifolia*, a mais importante economicamente entre a família das Asteraceae. É uma planta nativa dos Andes que possui grandes raízes tuberosas, com grande quantidade de oligofrutanas

Cresce em tubérculos grandes, suculentos, com raízes que são reservatórios naturais de inulina, em florestas nebulosas da encosta leste dos Andes da Venezuela até o nordeste da Argentina cerca de 2.000m. Entre as plantas andinas, esta é atualmente a mais indicada a atrair a atenção mundial num futuro próximo devido a sua surpreendente variedade de vantagens e benefícios. Assim como outras espécies do gênero, suas raízes sintetizam inulina ou componentes relacionadas a inulina. Portanto, é um alimento promissor para diabéticos, e pode ser mais produtivo que outros já citados, como chicória e alcachofra, uma vez que tanto as raízes como os rizomas da planta são reservatórios de inulina, ao contrário dos outros, que sintetizam a inulina somente nas raízes (ZARDINI, 1991, GRAU e REA, 1997).

O yacon é rico em proteína bruta, K_2O e P_2O_5 , e forma dois tipos de bulbos: rizomas e raízes. Pesa entre 200 e 500g, podendo chegar a 2 kg. Sua composição é similar à da alcachofra. Os bulbos das raízes contêm, em termos de porcentagem (%): cinzas 3,59; proteína 6,02; gordura 1,32; fibra bruta 3,88; nitrogênio livre 85,19; K_2O 1,76; CaO 0,18; MgO 0,13; P_2O_5 0,31. Também contém inulina, altas concentrações de mono e dissacarídeos (cerca de 35% de frutose e 58% de glicose + sacarose), e polissacarídeos com baixo grau de polimerização (HOLA e MICHL, 1996). Dentre os vegetais que apresentam os maiores níveis de aminoácidos livres se encontra o suco de yacon, junto com os sucos de outros vegetais e frutas como batata, pêra, cebola, tomate, cenoura, e outros (KAPULER e GURUSIDDAH, 1994). Resultados de análises sugerem que os oligossacarídeos de yacon possuem ligação β -D-frutofuranosil (2-1), repetindo unidades com terminal sacarose e são, portanto, oligossacarídeos tipo frutana (GOTO et al., 1995).

Invertases têm um papel chave no metabolismo de sacarose de plantas superiores, apesar de não se saber ainda quais são todas as suas funções e como atuam. Invertases de plantas podem exercer seus diferentes papéis em todo o metabolismo de açúcares, transporte e armazenamento, pela regulação da concentração de sacarose em locais específicos (VAN den ENDE e VAN LAERE, 1995). O metabolismo das plantas superiores em si implica na existência de pelo

menos duas diferentes invertases em seus tecidos (CHENG et al., 1990). Invertases (β -D-frutofuranosidases) têm um papel chave no metabolismo de sacarose destas plantas. A invertase, enzima que cliva a frutose da sacarose, e a inulinase, que libera frutose do final não redutor da inulina (polímero de frutose em ligação β -2,1 com terminal glicose), são 2 tipos de β -frutofuranosidases presentes em plantas que armazenam frutanas (KAUR et al., 1992). No citosol das plantas superiores a sacarose pode ser hidrolisada por uma invertase neutra ou uma sacarose sintase, gerando hexoses fosfato como substrato para a respiração, para síntese de polissacarídeos estruturais e possível formação de amido. Por outro lado, a sacarose pode ser transportada para o vacúolo, onde é armazenada como tal ou polimerizada em frutanas, como inulina em Asteraceae (por exemplo, espécies de *Cichorium*, *Helianthus*, *Taraxacum*, *Dalhia*), ou em cadeias mais complexas de frutanas, como ocorre em outros gêneros de plantas. A função fisiológica das diversas invertases é difícil de compreender totalmente, mas é possível que várias isoenzimas de invertase sejam ativas em diferentes microambientes, que variem em grau de acidez (GUPTA et al., 1991).

Material e Métodos

Preparo do extrato enzimático

O yacon foi adquirido diretamente de um produtor selecionado no Ceasa de Campinas. O yacon foi plantado na cidade de Piedade, no Estado de São Paulo. As raízes foram coletadas frescas (no máximo 48 horas após a colheita). Para a purificação estas mesmas raízes foram estocadas em geladeira por 15 dias, e então se procedeu a extração.

O extrato enzimático do yacon foi preparado segundo SHIOMI et al. (1979), com adaptações. Todas as etapas de extração foram realizadas a temperatura baixa, próxima de 4°C. As raízes foram lavadas em água corrente, descascadas e cortadas em pequenos pedaços. Os pedaços foram homogenizados em liquidificador com água destilada numa proporção de 1:1 (P/V). A homogeneização

foi feita por pulsos de 2 segundos cada, cerca de 15 vezes. O homogenato foi filtrado em lã de vidro e então centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 5° C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi chamado “extrato bruto”.

Purificação

O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio com 60% de saturação por uma noite, seguido de centrifugação 10.000rpm por 15 minutos a 5° C. O precipitado foi ressuspenso em pequenos volumes de tampão citrato fosfato pH 5,5, 0,05M, e dialisado contra o mesmo tampão em concentração 0,01M. O dialisado foi liofilizado, e denominado extrato enzimático.

O extrato enzimático foi diluído em um pequeno volume de tampão e aplicado em coluna de Sephadex G 200 (2,5 x 40cm), pré-equilibrada com tampão citrato fosfato pH 5,5 a 0,05M. As proteínas foram eluídas com 1.000 mL do mesmo tampão, e as frações de 3mL foram coletadas num fluxo de 18 mL/hora. As frações coletadas entre 660 e 870 mL, contendo cerca de 0,142 U/mL de atividade de invertase foram homogenizadas, seguida de liofilização.

Esta fração foi diluída em pequeno volume de tampão citrato fosfato pH 5,5 a 0,05M e aplicada em coluna Q-Sepharose Phast Flow. Foi utilizado equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) Pharmacia, com coluna de 5 mL de capacidade. A proteína foi eluída com o mesmo tampão com gradiente linear de NaCl, de 0 a 1M, num fluxo de 5 mL/min.

Atividade enzimática

A reação para atividade enzimática ocorreu a 40°C por 2 horas em pH 5,5, utilizando sacarose como substrato em concentração final de 15% com relação ao volume final da reação. O produto da hidrólise foi medido pelo método de Somogy-Nelson (1944), utilizando-se glicose como padrão. A proporção enzima: substrato foi de 1:2,5.

Uma unidade de invertase foi definida como a quantidade de extrato enzimático que catalisa a produção de 1 μ mol de açúcar redutor como glicose por minuto.

Peso molecular

O peso molecular da invertase de yacon foi estimado utilizando-se coluna de filtração em gel Sephacril S-200, em FPLC. Foram utilizados padrões entre 29 e 200KDa. Também foi estimado por comparação com os padrões da eletroforese SDS-PAGE.

Efeito de agentes químicos

Foram testados os efeitos dos compostos iodo, KCl, MgSO₄, CaCl₂, ZnSO₄, CoCl₂, CuSO₄, nas concentrações de 1 e 10mM, na atividade da enzima. Foram testados também os efeitos dos inibidores cloridrato de cisteína, EDTA, iodoacetamida, β -mercaptoetanol, bissulfito de sódio e azida de sódio, também nas concentrações de 1 e 10mM. A enzima foi incubada com cada um dos agentes separadamente a 40° C por 30 minutos, e então medida sua atividade a pH 5,5 e 60° C.

Determinação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951), com soro albumina bovina como padrão. A quantidade de proteína nas frações cromatográficas foi medida por absorbância a 280nm.

Eletroforese

A eletroforese foi realizada de acordo com LAEMMLI (1970). A amostra foi fervida com 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2% (V/V) de 2-

mercaptoetanol, e submetida a eletroforese em gel de acrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 12,5%, em equipamento Pharmacia Biotech SE250 Phastsystem. Foi utilizado padrão de calibração de baixo peso molecular Pharmacia, variando entre 14,4 e 97KDa (14,4 – 20,1 – 30 – 45 – 66 – 97). O gel foi corado com nitrato de prata.

Teste de pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi realizado teste de pureza da invertase purificada através de corrida da amostra em HPLC. Foi utilizado sistema Waters, coluna μ Bondapack C18, com sistema de detecção UV a 280 e 220 nm. A amostra foi eluída com TFA (ácido trifluoracético) 0,01%, e gradiente de acetonitrila 66%, de 0 a 100% em 60 minutos. Foi utilizado fluxo de 1 mL/min. A amostra aplicada foi a obtida na última etapa da purificação.

Caracterização bioquímica

A enzima purificada foi caracterizada bioquimicamente quanto a pH e temperatura ótimos de atuação, pH e temperatura de estabilidade e parâmetros cinéticos.

Para determinação de temperatura e pH ótimos foi usado planejamento fatorial completo, com temperaturas entre 25° e 65° C, e valores de pH entre 4,0 e 8,0. Foi utilizado tampão citrato fosfato para valores de pH entre 4,0 e 5,5 e tampão fosfato para valores de pH entre 6,0 e 8,0.

Para a determinação da temperatura de estabilidade a enzima foi incubada em diferentes temperaturas, com variações entre 25°C e 60°C, a pH 5,5, por 1 e 2 horas. Para a determinação do pH de estabilidade a enzima foi incubada em tampão citrato fosfato para os valores de pH entre 5,0 e 6,0, e tampão fosfato para os valores de pH entre 6,5 e 7,0 por 24 horas. A atividade residual foi medida em pH 5,5 a 40° C, com reação de 2 horas.

O efeito da concentração de substrato foi medido para substrato sacarose, utilizando-se o método gráfico de Lineweaver - Burk para se obter K_m e $V_{\text{máximo}}$.

Resultados e Discussão

Purificação parcial

A enzima invertase foi extraída após 15 dias de armazenamento das raízes de yacon a baixa temperatura (4°C), quando sua atividade é maior (dados não mostrados).

O comportamento da invertase durante a purificação pode ser acompanhado na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Purificação parcial de invertase de yacon

<i>Passos da purificação</i>	<i>Atividade (U/ml)</i>	<i>Proteína (mg/ml)</i>	<i>Atividade específica</i>	<i>Fator de purificação</i>
Extrato bruto	0,0038	17,7	0,0002	1
Precipitação (NH_4) ₂ SO ₄ , diálise e liofilização	0,142	5,36	0,0272	136
Sephadex G200	0,0056	0,85	0,0066	33
Q Sepharose	0,0046	0,31	0,0148	74,2

O melhor fator de purificação da enzima invertase de yacon foi obtido na primeira etapa, com precipitação (NH_4)₂SO₄ a 60%, e posterior diálise e liofilização.

O gráfico da etapa de purificação utilizando coluna aberta de Sephadex G-200 pode ser visualizado na Figura 6.1.

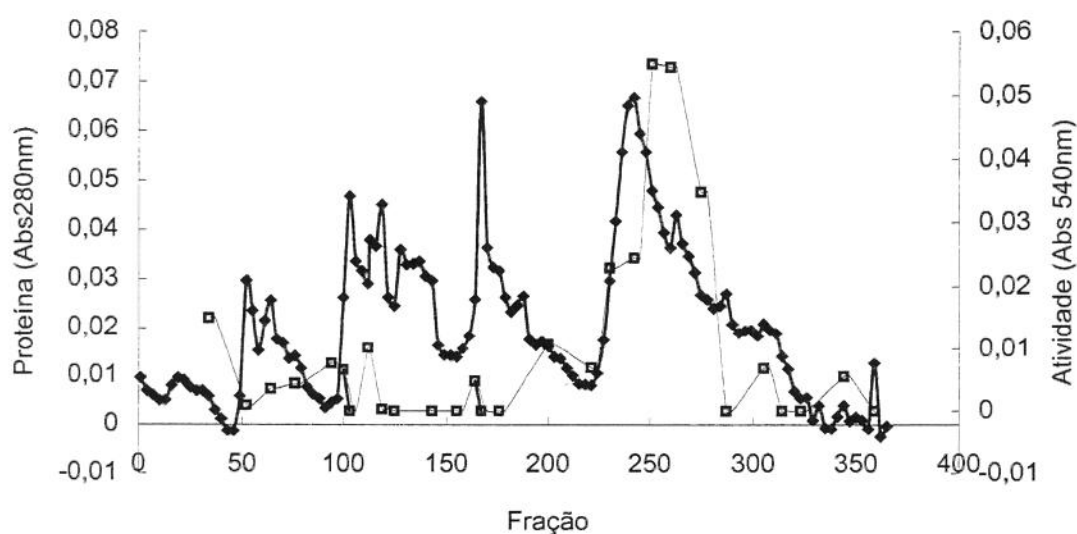


Figura 6.1: Perfil cromatográfico da purificação da invertase de yacon em coluna aberta de Sephadex G-200. □ representa a atividade enzimática e ◆ representa proteínas.

A invertase ácida isolada do yacon tem característica aniônica, uma vez que adsorveu em resina trocadora de íons do tipo catiônica forte (Q-Sepharose) e foi eluída com gradiente NaCl.

Eletroforese

A eletroforese SDS-PAGE (Figura 6.2) mostra a presença de uma banda próxima ao padrão de PM 66 KDa, constituída de 3 pequenas bandas muito unidas. Em todas as etapas da purificação esta banda foi característica, podendo indicar a presença de isoenzimas da invertase.

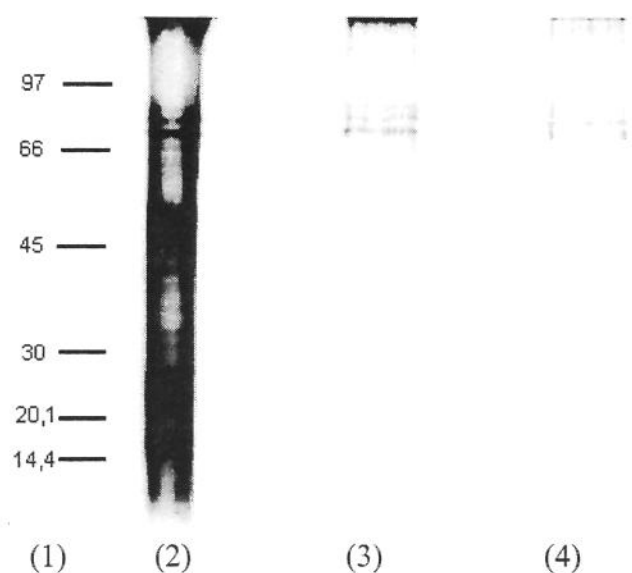


Figura 6.2: SDS-PAGE. (1): marcadores de PM em KDa. (2): amostra após resina G200. (3) e (4): amostra após resina Q-Sepharose.

Peso molecular

O peso molecular estimado pela filtração em gel Sephacril S-200 foi de 68 KDa. A curva obtida, como pode ser visualizada na Figura 6.3, foi ($y = -1,265x + 3,6707$), onde $y = \log PM$ e $x = V_e/V_o$, com $r^2 = 0,902$. Este valor é coerente com o perfil revelado pela SDS-PAGE, onde a banda de invertases tem R_f próximo ao do padrão correspondente a 66 KDa.

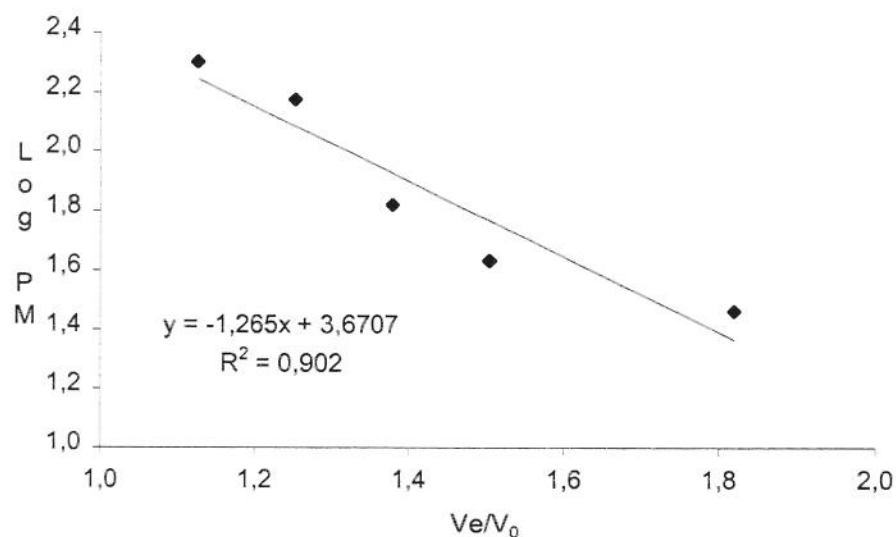


Figura 6.3: Curva padrão para determinação de peso molecular em coluna de gel Sephacryl S-200.

Teste de pureza por HPLC

O perfil cromatográfico da invertase após a última etapa de purificação, em coluna Q-Sepharose, pode ser visualizado na Figura 6.4.

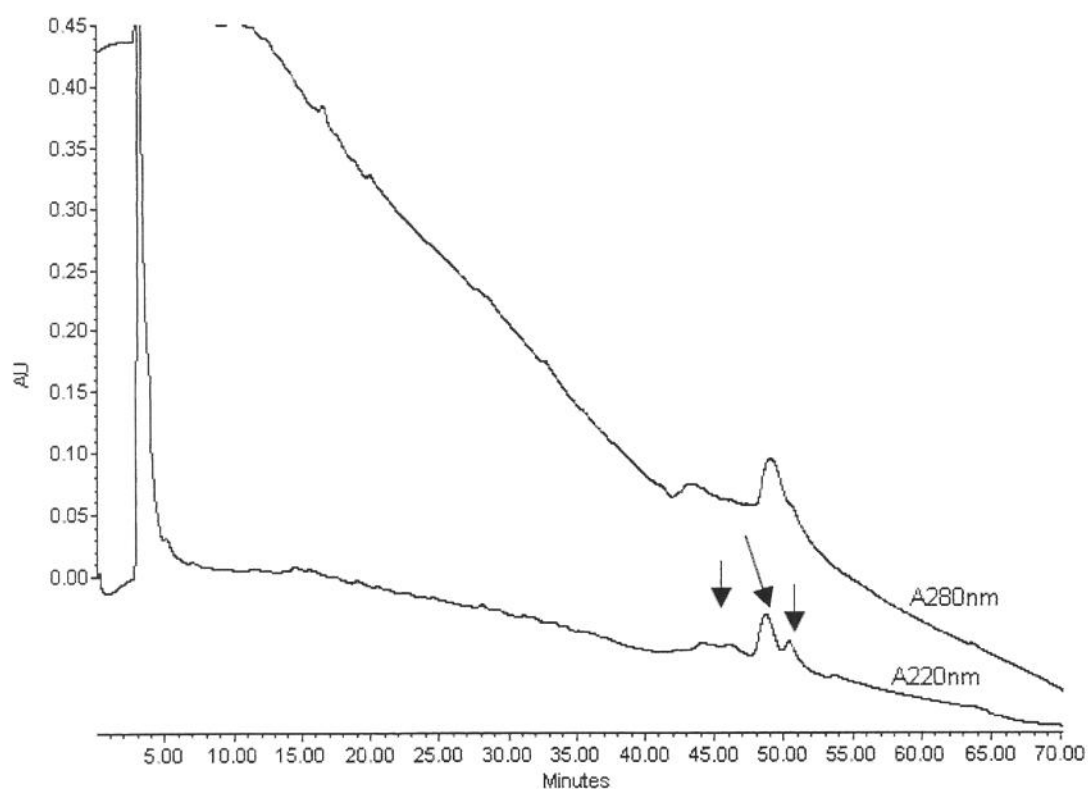


Figura 6.4: Perfil cromatográfico da invertase de yacon 280nm e a 220 nm.

A figura indica a presença de um único pico a 280nm. Quando a detecção foi feita a 220nm, há a presença de 3 pequenos picos, com tempos de retenção muito próximos. A medida de absorbância a 220nm foi feita para se detectar ligações peptídicas que não são detectadas a 280nm, possibilitando uma melhor visualização ou separação de possíveis picos (no caso, proteínas) dentro de um pico maior detectado a 280nm. O tempo de retenção a 280 e 220nm foi o mesmo. Isto pode indicar que há a presença de isoenzimas nesta fração. A análise coincide com o perfil obtido para a mesma fração em SDS-PAGE.

Caracterização da invertase

O pH ótimo e a temperatura ótima da invertase podem ser acompanhados nas figuras 6.5 e 6.6 respectivamente.

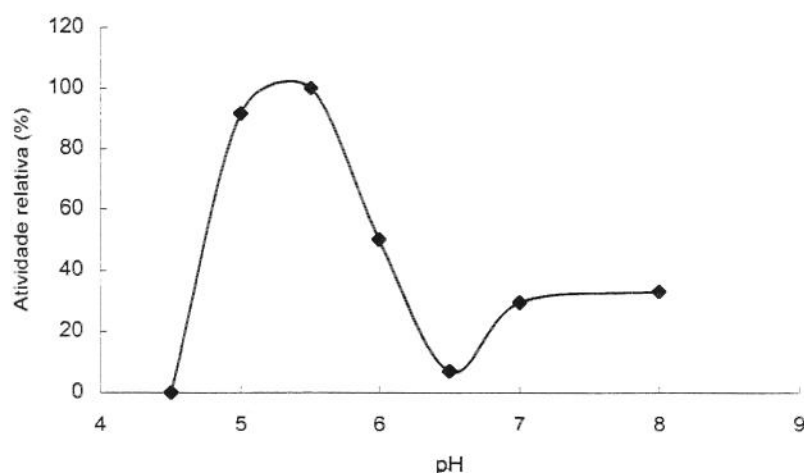


Figura 6.5: pH ótimo de atuação da invertase de yacon.

O pH ótimo de atuação da invertase de yacon foi de 5,5. Este valor é próximo aos de invertases ácidas extraídas de outras plantas, como pH 4,5 a 5,0 para invertase de melão (RANWALA et al., 1991); 5,25 para invertases de folhas de *Tropaelum* (ISLA et al., 1988); entre 3,5 e 5,0 para invertases de raízes de *Heliantus tuberosus* (KOOPS e JONKER, 1996); 4,0 para invertases de raízes de dente de leão (RUTHERFORD e DEACON, 1972); 4,0 e 5,6 para invertases de pólen de lírio (SINGH e KNOX, 1984); entre 5,0 e 5,5 para invertases de folhas de chicória (GUPTA et al., 1991); 5,0 para invertases de raízes de chicória (CLAESSENS et al., 1990); entre 4,5 e 5,5 para invertases de cenoura (UNGER et al., 1992); entre 3,5 e 5,4 para raízes de *Solanum tuberosum* (ISLA et al., 1999).

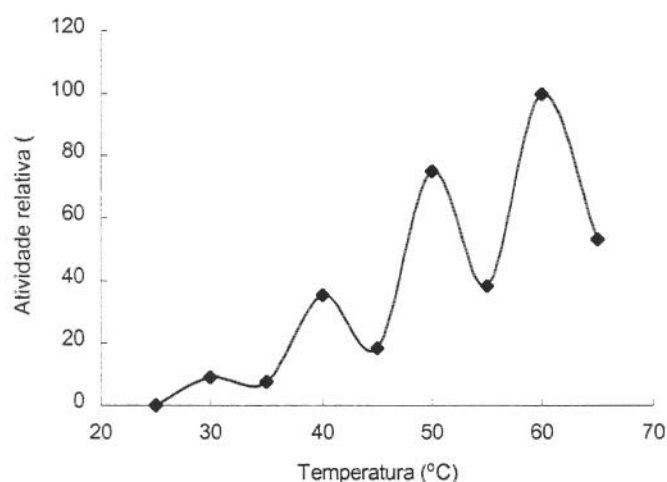


Figura 6.6: Temperatura ótima de atuação da invertase ácida de yacon.

A temperatura ótima de atuação da invertase de yacon foi de 60° C. O comportamento da fração indicou 3 picos de temperatura com melhor atuação das enzimas, sendo mais um indicativo da presença de 3 isoenzimas nesta fração, como sugerido na SDS-PAGE e na análise em HPLC. O comportamento de isoenzimas de invertases independentes de cana de açúcar, que atuam em diferentes microambientes, foi sugerido por GUPTA et al. (1991).

Invertases de outras plantas têm como temperatura ótima: 50° C para invertase de melão (RANWALA et al. , 1991); 37° C para invertases de folhas de *Tropaelum* (ISLA et al., 1988); 34° C para invertases de raízes de *Heliantus tuberosus* (KOOPS e JONKER, 1996); 45° C para invertases de folhas de chicória (GUPTA et al., 1991); 37° C para raízes de *Solanum tuberosum* (ISLA et al., 1999).

O pH e a temperatura de estabilidade da invertase podem ser acompanhados nas figuras 6.7 e 6.8 respectivamente.

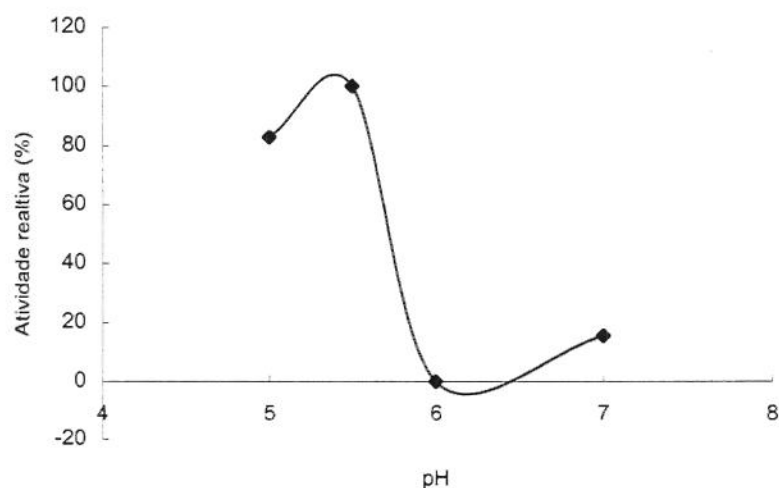


Figura 6.7: pH de estabilidade da invertase de yacon a 40° C.

A invertase de yacon não tem muita estabilidade ao pH. Em pH 5,0 a enzima mantém 80% de sua atividade, em pH 5,5 a estabilidade é máxima. A partir de pH 6,0 a enzima não tem nenhuma estabilidade, perdendo totalmente a atividade. Invertases de melão mantêm 30% de sua atividade máxima a pH 2,5 (RANWALA et al., 1991); invertases de pólen de lírio (SINGH e KNOX, 1984) mantêm 60% de sua atividade máxima a pH 7,0.

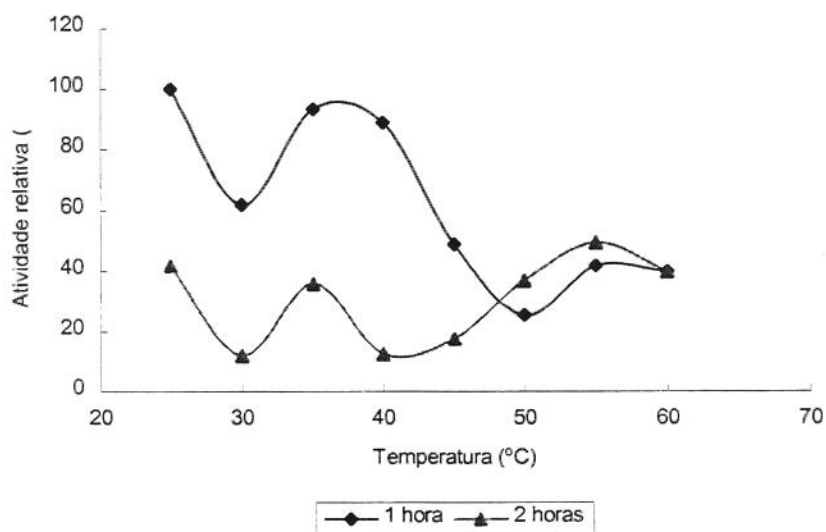


Figura 6.8: Temperatura de estabilidade da invertase de yacon a pH 5,5.

Após 1 hora de incubação a invertase de yacon mantém mais de 90% de sua atividade máxima entre 35° C e 40° C, mas a 50° C a atividade fica abaixo de 20%. Após 2 horas de incubação a enzima perde no mínimo 60% de sua atividade máxima, sendo quase inativada a 30° e 40° C (menos de 10% de atividade). Invertases de pólen de lírio (SINGH e KNOX, 1984) são termoestáveis a temperaturas abaixo de 40° C, mas perdem 60% de atividade a 50° C. Observa-se que quando submetido o EEY a temperaturas até 40° C o tempo de exposição teve forte influência na atividade enzimática, mas a partir de 50° C a perda de atividade enzimática foi praticamente igual para 1 ou 2 horas de exposição. Isto indica que temperaturas acima de 50° C atuam fortemente na atividade enzimática já na primeira hora de exposição.

O efeito da concentração de substrato e a cinética de M-M podem ser acompanhados nas figuras 6.9 e 6.10 respectivamente.

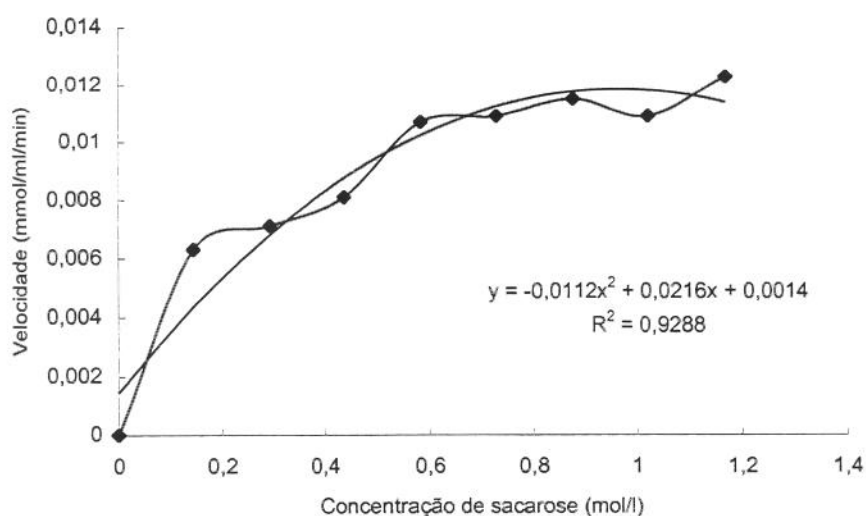


Figura 6.9: Efeito da concentração de sacarose na atividade da invertase de yacon a 60° C, pH 5,5 por 2 horas.

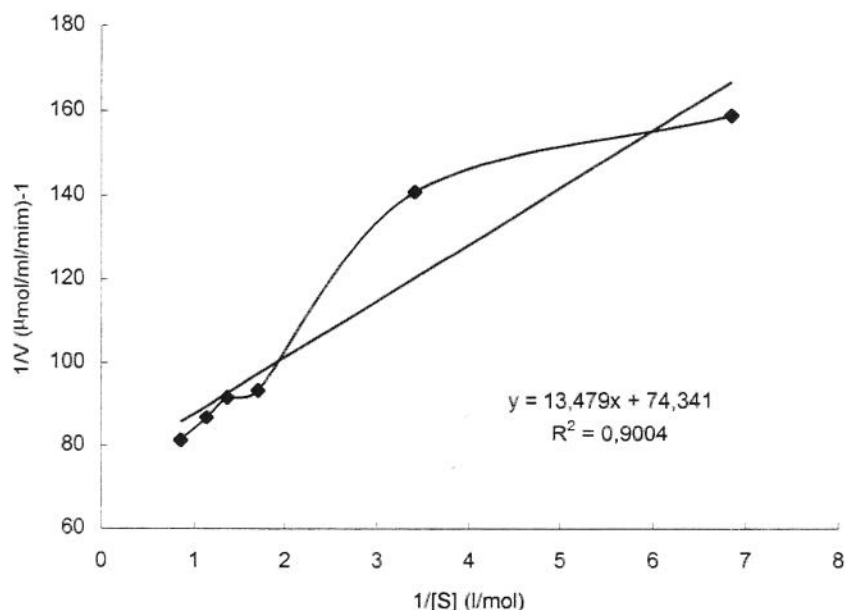


Figura 6.10: Detrminação gráfica dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da invertase semi purificada de yacon, de acordo com Lineweaver-Burk. Os cálculos com a equação da reta levam a $V_{m\acute{a}x} = 0,0134 \mu\text{mol/ml/min}$ e $K_m = 0,1812 \text{ M}$.

A invertase de yacon segue a cinética de M-M, com um K_m de 0,1812M. Invertases ácidas de batatas doces apresentaram K_m de 4,5mM (0,0045M) (MATSUSHITA e URITAI, 1974). Invertases ácidas de *Solanum tuberosum* apresentaram $K_m = 0,028\text{M}$ para sacarose (ISLA et al., 1999). RUTHERFORD e DEACON (1972) estimaram a constante de M-M para hidrolases de raízes de dente de leão como $K_m = 1,54 \times 10^{-2}\text{M}$, considerando que estas enzimas seguem este modelo cinético.

A enzima invertase ácida isolada do yacon provavelmente possui três isoformas, como sugerem os perfis eletroforético e de cromatografia líquida. O comportamento da enzima durante a caracterização, principalmente com relação a temperatura, também é um indício da presença de isoformas na fração. A enzima não se encontra totalmente pura.

Efeito de agentes químicos

Os efeitos dos agentes químicos testados podem ser acompanhados na tabela 6.2.

Tabela 6.2: Efeito de diferentes íons metálicos e inibidores na atividade da invertase de yacon.

Agente	1mM	10mM
Cloridrato de cisteína	120.03	0
EDTA	92.44	111.05
Iodoacetamida	37.21	0
β -mercaptoetanol	122.09	0
Bissulfito de sódio	84.89	71.51
Azida sódica	61.05	50
Iodo	90.11	27.91
KCl	125.58	97.67
MgSO ₄	0	23.26
CaCl ₂	113.37	36.63
ZnSO ₄	46.51	41.86
CoCl ₂	151.16	167.44
CuSO ₄	57.56	15.70
Controle	100	100

EDTA quase não causou efeito na atividade da invertase de yacon, indicando que metais não são essenciais para a ação de hidrólise dessa enzima (OLIVEIRA, 1997).

A cisteína e o β -mercaptoetanol promoveram ligeiro aumento de atividade da invertase a 1mM de concentração, mas inibiram-na totalmente a 10mM.

O efeito da iodoacetamida foi de inibição e gradativo de acordo com a concentração utilizada (mais de 60% de inibição para 1mM, e 100% para 10mM).

A iodoacetamida pode modificar ligações imidazol e de grupos sulfidrila, inibindo a atividade catalítica de algumas enzimas (STRYER, 1995).

A inibição da invertase de yacon por bissulfito de sódio nas concentrações de 1 e 10mM foi de cerca de 15 a 20%.

Azida sódica nas concentrações de 1 e 10mM inibiu entre 40 e 50% a enzima em estudo.

Baixa concentração de iodo (1mM) inibiu a atividade da invertase de yacon em 10%, enquanto que 10mM inibiu em mais de 70% a enzima. O iodo é específico para tirosina, e esse resultado sugere que grupos fenol possam fazer parte ou estar próximos ao sítio ativo da enzima (OLIVEIRA, 1997).

KCl nas concentrações de 1 e 10mM não teve influência significativa na atividade enzimática da invertase de yacon.

MgSO₄ na concentração 1mM inibiu totalmente a invertase de yacon, e na concentração 10mM em torno de 80%.

CaCl₂ na concentração 1mM ativou cerca de 13% a atividade da enzima, mas na concentração final 10mM inibiu mais de 60% a atividade da invertase.

O sal CoCl₂ nas concentrações de 1 e 10mM atuou como ativador aumentando 50 e 67%, respectivamente, a atividade da invertase, indicando que o íon cobalto possa ter participação no sítio ativo da invertase de yacon.

Zinco e cobre são inibidores parciais da enzima em estudo. Nas concentrações de 1 e 10mM o sal ZnSO₄ inibiu entre 44 e 48%, respectivamente, enquanto que CuSO₄ inibiu entre 43 e 84% a atividade da invertase de yacon.

Conclusões

A invertase ácida isolada do yacon tem característica aniônica.

A enzima invertase ácida isolada do yacon provavelmente possui três isoformas. A preparação enzimática de invertase de yacon obtida por fracionamento com sulfato de amônio 60%, cromatografia em coluna de filtração em gel Sephadex e de Q-Sepharose Phast Flow não se apresentou na forma pura.

A caracterização da enzima indicou pH ótimo 5,5 e temperatura ótima 60° C para sua atividade máxima com substrato sacarose. A enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, com K_m de 0,1812 M e $V_{m\acute{a}x} = 0,0134 \mu\text{mol/ml/min}$ para o substrato sacarose.

A invertase ácida isolada do yacon apresenta baixa estabilidade tanto a temperatura quanto a pH, sendo facilmente desnaturada fora de suas condições ótimas de atuação.

A atividade da invertase ácida isolada do yacon foi totalmente inibida por cisteína, β -mercaptoetanol e iodoacetamina na concentração de 10mM e por MgSO_4 a 1 mM.

Íons de cálcio na concentração 1mM, cobalto nas concentrações de 1 e 10mM e potássio concentração 1mM ativaram a invertase de yacon, sugerindo que possam fazer parte do sítio ativo da enzima. O íon magnésio inibe totalmente a enzima na concentração 1mM, enquanto íons de zinco e cobre nas concentrações 1mM e 10mM inibem-na parcialmente.

Referências Bibliográficas:

- CHENG, J. F.; MITSUYA, N.; JUANG, R. H.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of invertase isosymes from bamboo shoots. Taipei, Tailândia, **Biochemistry International**, v. 21, n. 3, p. 497 - 506, 1990.
- CLAESSENS, G.; LAER, A. V.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus*). Heverlee, Bélgica **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 35 - 39, 1990.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., *et al.* Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Shizuoka, Japão, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.12, p. 2346 – 2347, 1995.
- GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M., e Heller, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahupa, arracha, maca, yacon**: Promoting the conservation and use of understanding and neglected crops. Gater Slaben, Institute of plant genetics and crop plant research, 1997. Capítulo 21, pp. 199 – 241. Disponível em: <http://www.cipotato.org/market/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 20 de maio de 2002.
- GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Luhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.
- HOLA, Z.; MICHL, J. (Yacon (*Polymnia sonchifolia*), a non tradicional source of fructose). *Listy Cukorvarnicke a Reparske*. Praga, República Checa, **Journal of Fruits Vegetables and Nuts**, v.110, n.7, p.194 - 196, 1996.

- ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; GUTIERREZ, M. I. SAMPIETRO, A. R. Acid invertase from *Tropaelum* leaves. Tucumán, Argentina, **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 1993 -1998, 1988.
- ISLA, M. A.; VATTUONE, M. A.; ORDÓÑEZ, R. M.; SAMPIETRO, A. R. Invertase activity associated with the walls of *Solanum tuberosum* tubers. Tucuman, Argentina, **Phytochemistry**, v. 50, p. 525 – 534, 1999.
- KAPULER, A. M.; GURUSIDDIAH, S. The twenty protein amino acids free in the juices of our common vegetables and herbs. Connecticut, EUA, **Journal of Home and Consumer Horticulture**, v.1, n.1, p.3 - 18, 1994.
- KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporim* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.
- KOOPS, A. J., JONKER, H. H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Heliantus tuberosus* Colombia. Wageningen, Holanda, **Plant Physiology**, v. 110, p. 1167 – 1175, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. London, **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Proteins measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.
- MATSUSHITA, K.; URITAI, I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. Nagoya, Japão, **Plant Physiology**, v. 54, p. 60 - 66, 1974.

- NELSON, N. A Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 379 –380, 1944.
- OLIVEIRA, I. M. A . **Produção e caracterização da β -fructofuranosidase de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** Campinas, 1997. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. 124 p.
- RANWALA, A. P.; IWANAMI, S. S.; MASUDA, H. Acid and neutral invertases in the mesocarp of developing muskmelon (*Cucumis melon* L. cv Prince) fruit. Hokkaido, Japão, **Plant Physiology**, v. 96, p. 8812 - 886, 1991.
- RUTHERFORD, P. P., DEACON, A. C. β -fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Bath, Reino Unido, **Biochemical Journal**, v.126, p. 569 - 573, 1972.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by Asparagus fructosyltransferases. Tokio, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.43, n.11, p.2233 -2244, 1979.
- SINGH, M. B., KNOX, B. Invertases of *Lilium* pollen - characterization and activity during *in vitro* germination. Pakville, Austrália, **Plant Physiology**, v. 74, p. 510 - 515, 1984.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 1064 p.

UNGER, C.; HOFSTEEGE, J.; STURM, A. Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Dacota carota*. Basel, Suíça, **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 915 - 921, 1992.

VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.

ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on "Yacon" *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). St. Louis, Estados Unidos, **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72 – 75, 1991.

CONCLUSÕES FINAIS

O yacon é uma fonte potencial de açúcares, principalmente de frutose e do frutooligossacarídeo 1-kestose (GF₂).

A composição dos açúcares contidos no yacon muda durante o armazenamento, com tendência de aumento de concentração como um todo, nas condições testadas.

Estão presentes enzimas do tipo invertase nos tecidos do yacon. Sua atividade muda de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento. A maior atividade das enzimas invertase foi detectada após 15 dias de armazenamento a 4° C (geladeira).

A composição de açúcares do yacon é diferente para plantas cultivadas em diferentes locais, com diferentes condições climáticas e de solo.

A forma mais eficiente de extração das enzimas invertase do yacon é com água destilada. A melhor forma de fracionamento destas enzimas é com sulfato de amônio a 60% de saturação.

A invertase de yacon semi purificada tem caráter aniônico, e provavelmente apresenta três isoformas.

A invertase de yacon semi purificada é ácida, apresenta pH ótimo 5,5 e temperatura ótima de 60° C. A enzima segue a cinética de Michaelis-Menten, com Km de 0,1812 M e Vmáx = 0,0134 µmol/ml/min para o substrato sacarose.

A invertase ácida isolada do yacon apresenta baixa estabilidade tanto a temperatura quanto a pH, sendo facilmente desnaturada fora de suas condições ótimas de atuação.

A atividade da invertase ácida isolada do yacon foi totalmente inibida por cisteína, β-mercaptoetanol e iodoacetamina na concentração de 10mM e por MgSO₄ a 1 mM.

Íons de cálcio na concentração 1mM, cobalto nas concentrações de 1 e 10mM e potássio concentração 1mM ativaram a invertase de yacon, sugerindo que possam fazer parte do sítio ativo da enzima. O íon magnésio inibe totalmente

a enzima na concentração 1mM, enquanto íons de zinco e cobre nas concentrações 1mM e 10mM inibem-na parcialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S., ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. Uttar Pradesh, Índia, e Denver, Estados Unidos, **Bioresource Technology**, n. 79, v. 2, p. 121 – 127, 2001.
- AKGOL, S., KACAR, Y., DENIZLI, A., ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. Ankara, Turquia, **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 281 – 288, 2001.
- ANÔNIMO A. **Info1 c: Fructooligosaccharides**. Capturado em 28 ago. 2001. Online. Disponível na Internet <http://maxpages.com>.
- ANÔNIMO B. **Latest research on elderberry pro...eimer's disease, phosphatidylserine**. Capturado em 20 dez. 1999. Disponível na Internet <http://www.nutritiondynamics.net>.
- ANÔNIMO C. **Supplemets A – Z**. Capturado em 23 ago. 2001. Disponível na Internet <http://supplementwatch.com>.
- ARAI, M.; MORI, H.; IMASEKI, H. Roles of sucrose metabolizing enzymes in growth of seedlings. Purification of acid invertase from growing hypocotyls of mung bean seedlings. Nagoya, Japão, **Plant and Cell Physiology**, v.32, n. 8, p. 1291 - 1298, 1991.
- ASAMI, T., MINAMISAWA, K., TSUKIHASHI, T., et al. Fluctuations of oligofructan contents in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. Ibaraki, Japão. **Japanese Journal of Soil Science Plant Nutrition**, v. 62, p. 621 – 627, 1991.

- BORNET, F. R. Undigestible sugars in food products. Paris, França, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, n. 3 Suppl, p.763S – 769S, 1994.
- BOUHNİK, Y., FLOURIE, B., RIOTTOT, M., et al. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. Paris, França, **Nutritional Cancer**, v.26, n.1, p.21 – 29, 1996.
- BHOWMIK, P. K., MATSUI, T., KAWADA, K., SUZUKI, H. Seasonal changes of asparagus spears in relation to enzyme activities and carbohydrate content. Kawaga, Japão, **Scientia Horticulturae**, v. 88, p. 1 – 9, 2001.
- CAIRNS, A. J. Evidence for *the de novo* synthesis of fructan by enzymes from higher plants: a reappraisal of the SST / FFT model. Aberystwyth, Reino Unido, **New Phytologist**, v. 123, p. 15 – 24, 1993.
- CHEN, J. Q., BLACK, C.C. Biochemical and immunological properties of alkaline invertase from sprouting soybean hypocotyls. Athens, Estados Unidos, **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v. 295, n. 1, p. 61 – 69, 1992.
- CHENG, J. F.; MITSUYA, N.; JUANG, R. H.; SUNG, H. Y. Purification and characterization of invertase isosymes from bamboo shoots. Taipei, Tailândia, **Biochemistry International**, v. 21, n. 3, p. 497 - 506, 1990.
- CISNEROS-ZEVALLOS, L., NÚÑEZ, R., CAMPOS, D., et al. Characterization and evaluation of fructooligosaccharides on Yacon roots (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. & End) during storage. Disponível em: http://ift.confex/2002/technoprogram/paper_14450.htm. Acesso em: 22 de maio de 2002.

- CLAESSENS, G.; LAER, A. V.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus*). Heverlee, Bélgica **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 35 - 39, 1990.
- DRUART, N., DE ROOVER, J. VAN DEN ENDE, W., GOUPIL, P., VAN LAERE, A., RAMBOUR, S. Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Cichorium intybus* L.) plants. Villeneuve Dascq, França, e Heverlee, Bélgica, **Planta**, v. 212, n. 3, p[. 436 – 443, 2001.
- D'SOUZA, S.F., MELO, J. S. Immobilization of bakers yeast on jute fabric through adhesion using polyethylenimine: application in an annular column reactor for the inversion of sucrose. Mumbai, Índia, **Process Biochemistry**, v. 36, p. 677 – 681, 2001.
- EDELMAN, J., JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Heliantus tuberosus* L. Irvine, EUA, **New Physiologist**, v. 116, p. 197 – 208, 1968.
- ERNEST, M.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A. Carbohydrate changes in chicory (*Cichorium intybus* L var Foliosum) during growth and storage. Surrey, Inglaterra, **Scientia Horticulturae** v. 63, n.3 – 4, p.251 – 261, 1995.
- FARINE, S., VERSLUIS, C., BONNICI, P. J., HECK, A., PESCHET, J. L., PUIGSERVER, V., BIGINI, A. Separation and identification of enzymatic sucrose hydrolysis products by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Marseille, França, e Utrech, Holanda, **Journal of Chromatography A**, v. 920, n. 1- 2, p. 299 – 308, 2001.

- FISHBEIN, L., KAPLAN, M., GOUGH, M. Fructooligosaccharides: a review. Washington, Estados Unidos, **Veterinary and Human Toxicology**, v.30, n.2, p.104 – 107, 1988.
- FUKAI, K., MIYAZAKI, S., NANJO, F., et al. Distribution of carbohydrates and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Fujieda, Japão, **Soil Science and Nutrition**, v.39, n.3, p. 567 – 571, 1993.
- GALINDO, S.S., GUIRAUD, J. P. Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. Montpellier, França, **Bioresource Technology**, v. 60, p. 15 – 20, 1997.
- GIBSON, G. R., BEATTY, E. R., WANG, X., et al. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Cambridge, Inglaterra, **Gastroenterology**, v.108, n.4, p. 975 – 982, 1995.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Cambridge, Inglaterra, **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401 – 1412, 1995.
- GOTO, K., FUKAI, K., HIKIDA, J., et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Shizuoka, Japão, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.12, p. 2346 – 2347, 1995.
- GRAU, A., REA, J. Yacon. *Smallanthus sonchifolia* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. In: Hermann, M., e Heller, J. (eds). **Andean roots and tubers: ahupa, arracha, maca, yacon**: Promoting the conservation and use of understanding and neglected crops. Gater Slaben, Institute of plant genetics and crop plant research, 1997. Capítulo 21, pp. 199 – 241. Disponível em:

<http://www.cipotato.org/market/abstracts/bherm.htm>. Acesso em 20 de maio de 2002.

GUEMAS, Y., BOUJTITA, M., EL MURR, N. Biosensor for determination of glucose in fruit juices by flow injection analysis. Nantes, França, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, n. 2 – 3, p. 171 – 181, 2000.

GUPTA, A. K.; MANN, P.; KAUR, N.; SINGH, R. Profiles of enzymes of sucrose metabolism in the leaves of chicory (*Cichorium intybus*) during development. Luhiana, Índia, **Plant science**, v.77, p.191 - 196, 1991.

HARTEMINK, R., VANLAERE, K.M.J, ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Wageningnen, Holanda, **Journal of Applied Microbiology**, v.383, p. 367-374, 1997.

HENSON, C. A. , LIVINGSTON III, D. P. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolases multiple fructofuranosidic linkages. Madison e Raleigh, Estados Unidos, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 715 – 720, 1998.

HIDAKA, H., EIDA,T., TAKIZAWA, T., et al. Effects of fructooligosaccharids on intestinal flora and human health. Tokio, Japão, **Bifidobacterium Microflora**, v. 5, p. 37-50, 1986.

HOLA, Z.; MICHL, J. (Yacon (*Polymnia sonchifolia*), a non tradicional source of fructose). *Listy Cukorvarnicke a Reparske*. Praga, República Checa, **Journal of Fruits Vegetables and Nuts**, v.110, n.7, p.194 - 196, 1996.

HONDO, M., OKUMURA, Y., YAMAKI, T. A preparation of yacon vinegar containing natural fructooligosaccharides. Hokkaido, Japão, **Journal of the**

Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, v. 47, n. 10, p. 803 – 807, 2000.

HUANG, Y. H., PICHA, D. H., KILILI, A. W., JOHNSON, C. E. Changes in invertase activities and reducing sugar content in sweet potato stored at different temperatures. Baton Rouge, EUA, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4927 – 4931, 1999.

ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; GUTIERREZ, M. I. SAMPIETRO, A. R. Acid invertase from *Tropaelum* leaves. Tucumán, Argentina, **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 1993 -1998, 1988.

ISLA, M. A.; VATTUONE, M. A.; ORDÓÑEZ, R. M.; SAMPIETRO, A. R. Invertase activity associated with the walls of *Solanum tuberosum* tubers. Tucuman, Argentina, **Phytochemistry**, v. 50, p. 525 – 534, 1999.

IZZO, M., NINESS, K. R. Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. Malvern, **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 102 – 106, 2001.

KAPULER, A. M.; GURUSIDDIAH, S. The twenty protein amino acids free in the juices of our common vegetables and herbs. Connecticut, EUA, **Journal of Home and Consumer Horticulture**, v.1, n.1, p.3 - 18, 1994.

KAUR, N., KAUR, M., GUPTA, A. K., SINGH, R. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporim* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. Ludhiana, Índia, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 279 – 284, 1992.

KIZILYAR, N., AKBULUT, U., TOPPARE, L., ÖZDEN, M. Y., YAGCI, Y. Immobilization of invertase in conducting polypyrrole / polytetrahydrofuran graft

polymer matrices. Ankara e Istanbul, Turquia, **Synthetic Metals**, v. 104, p. 45 – 50, 1999.

KOOPS, A. J., JONKER, H. H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. Wageningen, Holanda, **Plant Physiology**, v. 110, p. 1167 – 1175, 1996.

KURODA, S., ISHIRARA, J. Field growth characteristics of plantlets propagated *in vitro* and line selection for increased percentage of sugar in tuberous root of yacon, *Polymnia sonchifolia*. Kioto, Japão, **Bulletin of the Shikoku National Agricultural Experiment Station**, v.57, p.111 - 121, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. London, **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LOPEZ, H. W., COUDRAY, C., LEVRAT-VERNY, M. A., et al. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. Clermont-Fd/Theix, França, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.500 – 508, 2000.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Proteins measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.

MARX, S. P., NÖSBERGER, J., FREHNER, M. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). Zurich, Suíça, **New Phytologist**, v. 135, p. 267 – 277, 1997.

- MASUDA, H.; TAKAHASHI, T.; SUGAWARA, S. The occurrence and properties of alkaline invertase in mature roots of sugar beets. Hokkaido, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2309 - 2314, 1987.
- MATSUSHITA, K.; URITAI, I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. Nagoya, Japão, **Plant Physiology**, v. 54, p. 60 - 66, 1974.
- MODLER, H. W., MCKELLAR, R.C., YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. Kamptville, Canadá, **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, v. 23, p. 29-41, 1990.
- MODLER, H. W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. Kamptville, Canadá, **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.
- MOLIS, C., FLOURI, B., OUARNE, F., et al. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. Nantes, França, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.3, p. 324 – 328, 1996.
- MORO, G., MINOLI, I., MOSCA, M., et al. Dosage-related effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. Milão, Itália, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 291 – 295, 2002.
- MUKHERJEE, K., SENGUPTA, S. Purification and properties of a nonspecific β -fructofuranosidase (inulinase) from the mushroom *Panaeolus papillonaceus*. Calcutta, Índia, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 520 - 524, 1987.
- NELSON, N. A Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 379 – 380, 1944.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1402 – 1406S, Suppl. S, 1999.

OHTA, A., OSAKABE, N., YAMADA, K., et al. Effects of fructooligosaccharides and other saccharides on Ca, Mg and P absorption in rats. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Japanese Nutrition and Food Science**, v.46, n.2, p.123 – 129, 1993.

OHTA, A., BABA, S., TAKIZAWA, T., et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium in the magnesium-deficient rats model. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.40, p.171 – 181, 1994.

OHTA, A., OHTSUKI, M., BABA, S., et al. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutrition**, v.125, p.2417 – 2424, 1995a.

OHTA, A., OHTSUKI, M., BABA, S., et al. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. Sakado Shi Saitama, Japão, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.41, p.281 – 291, 1995b.

OHYAMA, T., ITO, O., YASUYOSHI, S., et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Tsukuba / Ibaraki, Japão, **Soil Science and Plant Nutrition**, v.36, n.1, p.167 – 171, 1990.

OLIVEIRA, I. M. A . **Produção e caracterização da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos.** Campinas, 1997. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos

da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. 124 p.

PAVLINOVA, O. A., BALAKHONTSEV, E. N., PRASOLOVA, M. F., TURKINA, M. V. Sucrose-phosphate syntase, sucrose synthase, and invertase in sugar beet leaves. Moscow, Rússia, **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 49, n. 1, p. 68 – 73, 2002.

PESHIN, A. Influence of storage temperature on invertase activity and sugar content in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Shimla, Índia. **Indian Journal of Plant Physiology**. v. 5, n. 3, p. 297 – 299, 2000.

RANWALA, A. P.; IWANAMI, S. S.; MASUDA, H. Acid and neutral invertases in the mesocarp of developing muskmelon (*Cucumis melon* L. cv Prince) fruit. Hokkaido, Japão, **Plant Physiology**, v. 96, p. 8812 - 886, 1991.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparin their physiological effects. Cambridge, Inglaterra, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.2, p.103 – 108, 1993.

ROBINSON, H. Studies in the Heliantheae (Astereceae). XII. Re-establishment of the genus *Smallanthus*. **Phytologia**, v. 39, n. 1, p. 47 – 53, 1978.

RODRIGUEZ, J. A., AGUILAR, C. F., PADILLA, A. P. Enzyme preparation with invertase from yeast cell lysate using tangential flow filtration. San Luis, Argentina, **Desalination**, v. 130, n. 2, p. 131 - 136, 2000.

ROSA, A. H., VICENTE, A. A., ROCHA, J. C., TREVISAN, H. C. A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. Araraquara, Brasil, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 368, n. 7, p. 730 – 733, 2000.

- RUTHERFORD, P. P., DEACON, A. C. β -fructofuranosidases from roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber). Bath, Reino Unido, **Biochemical Journal**, v.126, p. 569 - 573, 1972.
- SAKAI, K., OHTA, A., TAKASAKI, M., et al. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. Sakado, Japão, **Nutrition Research**, v.20 n.3, p.403 – 412, 2000.
- SCHAFFER, A. A. Invertases in young and mature leaves of *Citrus sinensis*. Rehovot, Israel, **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2275 - 2277, 1986.
- SCHUBERT, S., FEUERLE, R. Fructan storage in tubers of Jerusalem artichoke: characterization of sink strength. **New Phytologist**, v.136, n.1, p.115 – 122, 1997.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by Asparagus fructosyltransferases. Tokio, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.43, n.11, p.2233 -2244, 1979.
- SINGH, M. B., KNOX, B. Invertases of *Lilium* pollen - characterization and activity during *in vitro* germination. Pakville, Austrália, **Plant Physiology**, v. 74, p. 510 - 515, 1984.
- SPIEGEL, J. E., ROSE, R., KARABELL, P., et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Boston, Estados Unidos, **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.
- STEYN, D.G. Honey. In: BIRCH, G.G., GREEN, L.F. (ed) **Molecular structure on function of food carbohydrate**. New York – Toronto. John Wiley & Sons, 1973. p. 35 – 207.

- STRICKLING, J. A., HARMON, D. L., DAWSON, K.A., et al. Evaluation of oligosaccharides addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. Topeka, Estados Unidos, **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.205 – 219, 2000.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 1064 p.
- TANASE, K., YAMAKI, S. Sucrose synthase isozymes related to sucrose accumulation during fruit development of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Nagoya, Japão, **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 69, n. 6, p. 671 – 676, 2000.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. Tanashi, Japão, **Food Technology**, v. 8, p. 61-65, 1994.
- UCHIYAMA, T., YONEDA, I., MURAKAMI, Y., et al. Identification of fructo-oligosaccharides from the bulbs of *Lycoris radiata* Herbert. Osaka, Japão, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.49, n.11, p.3315 – 3317, 1985.
- UNGER, C.; HOFSTEEGE, J.; STURM, A. Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Dacota carota*. Basel, Suíça, **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 915 - 921, 1992.
- VAN den ENDE, W., VAN LAERE, A. Purification and properties of a neutral invertase from roots of *Cichorium intybus*. Louvain, Bélgica, **Physiologia Plantarum**, v. 93, p.241 -248, 1995.
- VIETMEYER, N. D. (Edited by) - National Research Council. **Lost crops of the Incas little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation**. Washington Academy Press, 415p., 1989.

- VORSTER, D. J., BOTHA, F. Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. Natal, África do Sul, **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 651 – 655, 1998.
- WANG, X., GIBSON, G. R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Cambridge, Inglaterra, **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, n.4, p.373 – 380, 1993.
- WEI, B.; HARA, M.; YAMAUCHI, R.; UENO, Y.; KATO, K. (Fructooligosaccharides in the tubers of Jerusalem artichoke and Yacon). Hokkaido, Japão, **Research Bulletin of the Faculty of Agriculture**, v. 56, p.133 - 138, 1992.
- WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 625 p.
- WOLF, B. W., MEULBOROEK, J. A., JARVIS, K. P., et al. Dietary supplementation with fructooligosaccharides increase survival time in a hamster model of *Clostridium difficile*-Colites. Columbus, Estados Unidos, **Bioscience Microflora**, v.16, n.2, p.59 – 64, 1997.
- WOLF, B. W., FIRKINS, J. L., ZHANG, X. Varying dietary concentrations of fructooligosaccharides affect apparent absorption and balance of minerals in growing rats. Columbus, Estados Unidos, **Nutrition Research**, v.18, n. 10, p.1791 – 1806, 1998.
- YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, Y., KAWANO, M., et al. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and it hypocholesterolemic effects in rats. Osaka, Japão, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.10, p.13 – 18, 1999.

- YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. Fukuoka, Japão, **Nutrition Research**, v. 4, p. 961-966, 1984.
- YOUNES, H., GARLEB, K., BEHR, S., et al. Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. St-Genes Champanelle, França, **Journal of Nutrition**, v.125, n.4, p.1010 – 1016, 1995.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. Kyungbug, Coréia, **Enzymes and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.
- ZARDINI, E. Ethnobotanical notes on “Yacon” *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). St. Louis, Estados Unidos, **Economic Botany**, v. 45, n. 1, p. 72 – 75, 1991.