

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

**PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA
TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE,
UTILIZANDO-SE *Erwinia sp* D12 IMOBILIZADA COM
ALGINATO DE CÁLCIO.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ana Lúcia Leite Moraes**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de abril de 2002.

Ana Lúcia Leite Moraes
Farmacêutica-Bioquímica.

Campinas, 03 de abril de 2002

Prof.^a Dr.^a Hélia Harumi Sato
Orientadora.


Prof.^a Dr.^a Helia Harumi Sato
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS, SP.
2002

UNIDADE	DE
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	M791p
V	EX
TOMBO BC	48797
PROC	16-837102
	+
PREÇO	R\$11,00
DATA	07/05/02
Nº CPD	

CM00166936-0

BIBID. 244113

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

M791p Moraes, Ana Lúcia Leite
Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio / Ana Lúcia Leite Moraes. - Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Erwinia* sp. 2. Isomaltulose 3. Alginatos. 4.* Imobilização
I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

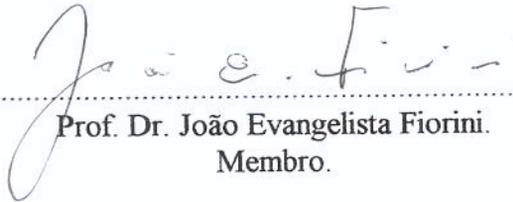
BANCA EXAMINADORA



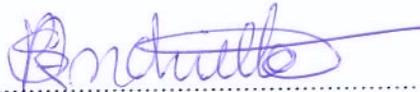
Profa. Dra. Hélia Harumi Sato.
Orientadora.



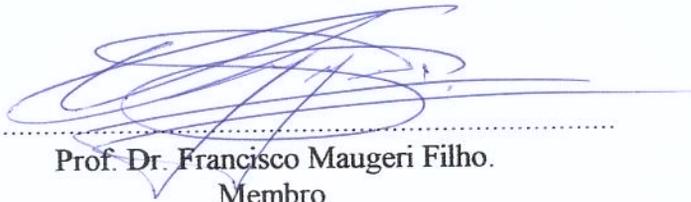
Prof. Dr. Yong Kun Park.
Membro.



Prof. Dr. João Evangelista Fiorini.
Membro.



Prof. Dr. Silvio Andrietta.
Membro.



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho.
Membro.

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant.
Membro.

Dra. Gláucia Maria Pastore.
Membro.

Sonho que se sonha só é
um sonho que se sonha só.
Mas sonho que se sonha
junto é realidade.

(Raul Seixas)

Dedico este trabalho às pessoas que amo, em especial aos meus queridos pais, Luiz e Madalena, sempre presentes em todos os momentos de minha vida ...

Ao Murilo, pelo amor, compreensão e estímulos recebidos durante esta jornada.
Aos meus irmãos Luiz Marcos e Plínio pelo carinho e a minha sobrinha Victória, nossa alegria.

AGRADECIMENTOS.

A Deus, pela vida...

À Profa. Hélia, pelo exemplo de profissionalismo e de dedicação ao ensino e a pesquisa, por sua orientação valiosa e pelos seus princípios de humanismo e de amizade.

Aos meus Pais Luiz e Madalena pela dedicação e disposição de sempre me acompanhar em todos os meus projetos.

Ao Murilo, pela ajuda valiosa durante a parte experimental deste trabalho e pelo exemplo de paciência, perseverança e dedicação aos projetos propostos.

Aos meus amigos Paulo, Yolanda, Nély, Silvia, Ette, Rose, Lia, Déborah, Andréa e Luiz Roberto, minha grande riqueza.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Berenice, Lilian, Ana Maria, Hermelinda, Heinz, Severino, Cláudio, Margarida, Joaquim, Masaharu, Gisele, Luciana Ferracini, Luciana, Fabiana, Marcelo, Dora, Bia, pelo incentivo, amizade e apoio recebidos.

Ao pessoal da república Nilda, Andres, Luiz, Kélly e Tita pela receptividade, carinho e estímulos recebidos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. João Evangelista Fiorini, Prof. Dr. Francisco Mauger Filho, Prof. Dr. Silvio Andrietta, Prof. Dr. Yong Kun Park, Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore e Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant, pelas críticas e sugestões, tão importantes para o enriquecimento deste trabalho e de meu conhecimento.

Ao CPQBA, na pessoa da Dra. Cláudia, pela oportunidade de realização das análises cromatográficas.

A UNICAMP, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À UNIFENAS, pela concessão da bolsa de estudos PICD-Capes e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

<u>ÍNDICE DE TABELAS.....</u>	<u>xiii</u>
<u>ÍNDICE DE FIGURAS.....</u>	<u>xv</u>
<u>ÍNDICE DE ANEXO.....</u>	<u>xvii</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>xix</u>
<u>SUMMARY.....</u>	<u>xxi</u>
<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	<u>3</u>
2.1. Considerações gerais sobre a isomaltulose.....	3
2.1.1. Cariogenicidade da isomaltulose.....	6
2.1.2. Digestão e absorção da isomaltulose.....	11
2.2. Produção da isomaltulose.....	14
2.3. Obtenção de linhagens mutantes.....	24
2.4. Imobilização Celular.....	26
2.4.1. Vantagens da imobilização de células.....	26
2.4.2. Alterações metabólicas em células imobilizadas.....	29
2.4.3. Problemas introduzidos pelo processo de imobilização celular.....	30
2.4.4. Métodos de imobilização e tipos de suporte.....	31
2.4.5. Fatores a serem considerados no processo de imobilização em alginato de cálcio.....	34
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>39</u>
3.1. Microrganismos produtores de glicosiltransferase.....	39

3.1.1. Estudo da produção de glicosiltransferase pelas linhagens <i>Klebsiella</i> sp K18, <i>Klebsiella</i> sp S-390, <i>Erwinia</i> sp D12 e 265-9.....	39
3.2. Obtenção de linhagens mutantes a partir da linhagem <i>Erwinia</i> sp D 12.....	43
3.2.1. Mutação com ultravioleta.....	43
3.2.2. Mutação com Metil-N-Nitroso-Guanidina.....	44
3.3. Seleção do microrganismo mutante produtor de glicosiltransferase.....	44
3.4. Otimização do cultivo do microrganismo selecionado.....	45
3.4.1. Efeito da concentração de sacarose ou melaço no meio de cultura sobre a produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	45
3.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	45
3.4.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C, 30°C e 32°C.....	45
3.5. Imobilização da massa celular.....	47
3.6. Otimização da produção de isomaltulose.....	49
3.6.1. Efeito da concentração de substrato e da temperatura na produtividade da célula imobilizada.....	49
3.7. Planejamento experimental e análise estatística.....	53
3.8. Purificação e Cristalização da isomaltulose.....	55
3.8.1. Processo de purificação.....	55
3.8.2. Processo de cristalização.....	57
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>59</u>
4.1. Microrganismos produtores de glicosiltransferase.....	59
4.2. Obtenção de linhagens mutantes a partir da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	60
4.3. Efeito da concentração de sacarose ou melaço no meio de cultura, na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	63

4.4. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	66
4.5. Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C, 30°C e 32°C.....	67
4.6. Efeito da concentração de substrato e da temperatura no rendimento de isomaltulose utilizando-se célula imobilizada de <i>Erwinia</i> sp D12.....	77
4.7. Purificação e cristalização da isomaltulose.....	90
<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	97
<u>6. SUGESTÕES PARA O PRÓXIMO TRABALHO.....</u>	99
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	101
<u>8. ANEXO.....</u>	115

ÍNDICE DE TABELAS.

TABELA 1. Níveis das variáveis independentes estudadas.....	54
TABELA 2. Ensaio do planejamento experimental realizado (Valores codificados e decodificados).....	55
TABELA 3. Produção de glicosiltransferase pelas linhagens <i>Erwinia</i> sp D12, <i>Klebsiella</i> sp S390, <i>Klebsiella</i> sp K18 e 265 – Efeito do tempo de fermentação na produção da enzima e crescimento celular.....	59
TABELA 4. Obtenção de cepas mutantes de <i>Erwinia</i> sp D12 após radiação ultravioleta.....	61
TABELA 5. Atividade de glicosiltransferase das linhagens mutantes obtidas após tratamento do microrganismo <i>Erwinia</i> sp D12 com o reagente metil-N-nitroso guanidina (MNNG).....	62
TABELA 6. Influência da concentração de sacarose (0-10%) ou de melaço (0-10% de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 em diferentes tempos de fermentação.....	64
TABELA 7. Influência da concentração de melaço (0-20% de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 em diferentes tempos de fermentação.....	65
TABELA 8. Influência da concentração de peptona no meio de cultivo, na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 em diferentes tempos de fermentação.....	67
TABELA 9. Influência da temperatura e do tempo de fermentação na atividade da glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12, durante a fermentação em um meio contendo melaço (12% de sólidos solúveis totais), extrato de carne 0,4% e peptona 4%.....	69

TABELA 10. Resultados dos ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12, realizados de acordo com o Planejamento Experimental.....	78
TABELA 11. Estimativa dos efeitos para produção de isomaltulose.....	79
TABELA 12. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se célula imobilizada de <i>Erwinia</i> sp D12 em função da concentração de substrato e da temperatura.....	80
TABELA 13. Rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12 em função da temperatura e concentração de sacarose do experimento em fatorial completo 2x3.....	83
TABELA 14. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12 em função da concentração de substrato (20-30%) e da temperatura (35-40°C), para o experimento fatorial completo 2x3.....	84
TABELA 15. Efeito da temperatura e concentração de sacarose na conversão enzimática da sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12.....	88
TABELA 16. Características do xarope de isomaltulose obtido após conversão enzimática da sacarose e durante o processo de purificação após tratamento com terra diatomácea e resinas de troca iônica.....	90
TABELA 17. Concentração de açúcares existentes no xarope obtido da transformação enzimática da sacarose e após o processo de purificação e cristalização.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1 – Processo de sonicação da parede celular.....	41
FIGURA 2 – Fermentação em mini-fermentador New Brunswick de 3 litros.....	47
FIGURA 3 – Processo de imobilização da massa celular de <i>Erwinia</i> sp D12 com alginato de cálcio.....	49
FIGURA 4 – Processo de conversão de sacarose em isomaltulose em colunas de leito fixo contendo células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas com alginato de cálcio.....	51
FIGURA 5 – Concentração do xarope através de um rota evaporador.....	57
FIGURA 6 – Processo de cristalização da isomaltulose.....	57
FIGURA 7 – Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C.....	71
FIGURA 8 Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 e produção de glicosiltransferase a 30°C.....	73
FIGURA 9 Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem <i>Erwinia</i> sp D12 e produção de glicosiltransferase a 32°C.....	75
FIGURA 10 - Curva de contorno referente ao rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose.....	81
FIGURA 11 – Rendimento de isomaltulose em função da concentração de sacarose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12.....	83
FIGURA 12 – Cromatografia dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pela enzima glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12.....	89

FIGURA 13 – Centrifugação dos cristais de isomaltulose.....	91
FIGURA 14 – Cristais de isomaltulose.....	93

ÍNDICE DE ANEXO.

ANEXO 1. “Ridge analysis” do máximo rendimento de isomaltulose durante a conversão enzimática da sacarose em isomaltulose, utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12.....	115
---	-----

RESUMO.

A isomaltulose (6-0- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose) é um dissacarídeo redutor, isômero estrutural da sacarose, encontrado naturalmente no mel e no caldo de cana-de-açúcar. Devido ao baixo potencial cariogênico, a isomaltulose é utilizada comercialmente na produção de doces e gomas de mascar. A isomaltulose é também empregada na produção de isomalte, um açúcar-álcool, de baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixa higroscopicidade, utilizado em produtos dietéticos e formulações farmacêuticas.

As linhagens *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp S390, *Klebsiella* sp K18 e 265-9 foram comparadas quanto a sua capacidade de produzir a enzima glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose. A linhagem *Erwinia* sp D12 apresentou a maior produção de glicosiltransferase. Esta linhagem foi submetida a tratamento com radiação ultravioleta e metil-N-nitroso-guanidina (MNNG), para indução de mutantes. Os mutantes obtidos não apresentaram maior atividade de glicosiltransferase que a cepa original.

A otimização do meio de cultivo de *Erwinia* sp D12 para produção de glicosiltransferase, foi realizada em frascos agitados, utilizando-se concentrações variadas de sacarose (0-10%) ou melaço (0-20% de sólidos solúveis totais), principalmente como fonte de carbono e energia e de peptona (0-10%) como fonte de nitrogênio. A maior atividade (12,8 unidades de atividade/mL do meio de cultura), foi obtida em meio de cultura contendo melaço (12% de açúcares totais), peptona 4% e extrato de carne 0,4 % após 15 horas de fermentação a 30°C.

No estudo do efeito do tempo e da temperatura na fermentação da linhagem de *Erwinia* sp D12, em fermentador New Brunswick de 3L, contendo meio de cultura composto de melaço (12% de sólidos solúveis totais), peptona 4% e extrato de carne 0,4 % foi obtido maior atividade de glicosiltransferase (15,6 unidades de atividade/ mL de meio de cultura), na fase exponencial de crescimento após 8 horas de fermentação a 30°C. Fermentações em temperaturas acima (32°C) ou abaixo (28°C) da ideal diminuíram a atividade de glicosiltransferase. O pH do meio de fermentação manteve-se entre 5,5 e 6,5 em todas as temperaturas testadas.

No processo de otimização do rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose utilizando-se células de *Erwinia* sp D 12 imobilizadas em alginato de cálcio, estudou-se o efeito da temperatura (25 – 35°C) e da concentração de substrato (12,5 – 60 %). Foi obtido um rendimento em torno de 50% de isomaltulose, com soluções de sacarose entre 20-30% a 35°C. Concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40%) afetaram a atividade da célula imobilizada, diminuindo a conversão de sacarose em isomaltulose.

O xarope obtido da conversão enzimática da sacarose em isomaltulose pelas células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, foi purificado através de cromatografia de troca iônica e o eluato obtido foi cristalizado por abaixamento de temperatura. Os cristais obtidos apresentaram 91,39% de isomaltulose.

SUMMARY

Isomaltulose (6-0- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose) is a reducing disaccharide, structural isomer of sucrose, naturally found in honey and sugar cane juice. Due to its low cariogenic potential, isomaltulose is commercially used to produce candies and chewing gums. Isomaltulose is also used to produce isomalt, a sugar alcohol characterized by its low caloric value, low cariogenicity and low hygroscopicity, applied to dietetic products and pharmaceutical formulations.

The strains *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp S390, *Klebsiella* sp K18 and 265 were compared in terms of their ability to produce a glucosyltransferase capable to convert sucrose into isomaltulose. *Erwinia* sp D12 presented the highest glucosyltransferase production. This strain was submitted to a treatment including ultraviolet radiation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in order to induce mutations. The glucosyltransferase activity of the mutants were not higher than the original strain.

The optimization of the culture medium for *Erwinia* sp D12 to produce glucosyltransferase was carried out in flasks under shaking conditions by using variable concentrations of sucrose (0-10%) or molasses (0-20% total soluble solid) as carbon and energy source and peptone (0-10%) as nitrogen source. The highest activity (12,8 units of activity /mL of culture medium), was obtained when a medium containing molasses (12% total soluble solid), peptone 4% and meat extract 0,4 % was used, after 15 hours of fermentation at 30⁰C.

The effects of time and temperature on the fermentation of *Erwinia* sp D12 in a 3L New Brunswick fermentor containing culture medium composed by molasses (12% total soluble solid), peptone 4% and meat extract 0,4% were evaluated. The highest glucosyltransferase activity (15,6 units of activity /mL of culture medium) was obtained during the exponential growth phase after 8 hours of fermentation at 30°C. Fermentations carried out at temperatures above (32°C) or below (28°C) decreased the glucosyltransferase activity. The pH of the fermentation medium was maintained between 5,5 and 6,5 for all temperatures tested.

In order to optimize isomaltulose yields from enzymatic transformation of sucrose by *Erwinia* sp D 12 cells immobilized in calcium alginate, the effects of temperature (25 – 35°C) and substrate concentration (12,5 – 60%) were evaluated. The yield of isomaltulose was approximately 50%, from sucrose solutions ranging from 20 to 30% at 35°C. Excess of sucrose (about 40%) affected the activity of the immobilized cell, decreasing conversion of sucrose into isomaltulose.

The syrup obtained from the enzymatic conversion of sucrose into isomaltulose by *Erwinia* sp D12 cells immobilized in calcium alginate was purified through Ion Exchange Chromatography, and the eluent was crystallized by the temperature decreasing method. The obtained crystals presented 91,39% of isomaltulose.

1. INTRODUÇÃO.

Através de métodos biotecnológicos e enzimáticos, é possível obter oligossacarídeos e polissacarídeos derivados da sacarose, de importância para a indústria de alimentos e farmacêutica. Uma das transformações possíveis consiste na transformação da sacarose em isomaltulose através do uso de glicosiltransferase microbiana.

A isomaltulose (6-0- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose) é um dissacarídeo redutor, isômero estrutural da sacarose (2-0- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose), encontrado naturalmente no mel e no caldo de cana-de-açúcar. A isomaltulose, também conhecida como palatinose, possui um sabor adocicado suave e propriedades físicas e organolépticas muito similares às da sacarose.

Devido ao baixo potencial cariogênico, a isomaltulose é utilizada comercialmente na produção de doces e gomas de mascar. A cárie dentária é a mais prevalente doença entre a população humana civilizada. A microbiota oral é constituída de microrganismos que geram ácidos através da degradação de carboidratos, levando a formação das cáries. A produção de ácidos pelo *Streptococcus mutans* é menor a partir de isomaltulose, quando comparado com a utilização da sacarose. Portanto, a isomaltulose é um substituto ideal da sacarose na prevenção das cáries. A isomaltulose é também empregada na produção de isomalte, um açúcar-álcool formado por quantidades equimolares de dois isômeros [α -D-glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + α -D-glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)], de baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixa higroscopicidade, utilizado em produtos dietéticos e formulações farmacêuticas.

A isomaltulose apresenta também uma grande aplicação industrial na formação de polímeros e surfactantes, representando uma fonte alternativa de produção destes compostos, pois atualmente os mesmos são produzidos pela indústria petroquímica, gerando riscos de contaminação ambiental. Uma outra aplicação da isomaltulose consiste na obtenção de oligômeros de isomaltulose (IBOs), que atuam como prebióticos, estimulando a proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal.

Existem várias linhagens de microrganismos descritas na literatura que promovem a conversão de sacarose em isomaltulose através da enzima glicosiltransferase, sendo que o primeiro registro foi do *Protaminobacter rubrum*, em 1958.

O emprego de microrganismos como biocatalisadores para obtenção de determinadas substâncias é bastante visado, uma vez que estes seres possuem grande poder de multiplicação e de adaptação às variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com o suprimento ou a carência de nutrientes do meio, o que permite uma ampla flexibilidade em sua utilização.

Objetivando ampliar as vantagens do emprego de células como biocatalisadores, têm-se estudado meios de se dispor os microrganismos em uma forma insolúvel ao substrato, ou seja, imobilizados em um suporte sólido. A imobilização é um procedimento vantajoso, pois permite o uso contínuo das células, previne contaminações de produtos com as células, estabiliza a biocatálise e mantém as células igualmente distribuídas no reator de maneira que cada molécula de enzima é provida com igual suprimento do substrato.

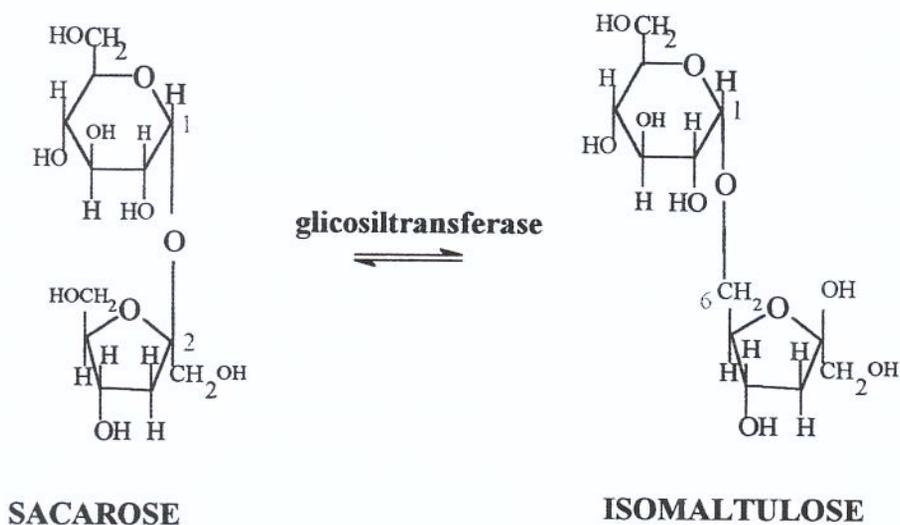
Este trabalho teve como objetivos :

- 1 – Selecionar a linhagem melhor produtora de glicosiltransferase, capaz de converter sacarose em isomaltulose, entre as linhagens *Klebsiella* sp K18, *Klebsiella* sp 390, *Erwinia* sp D12 e 265-9.
- 2 – Obtenção de linhagem mutante a partir da linhagem *Erwinia* sp D12, maior produtora de glicosiltransferase, através de mutação induzida com radiação ultravioleta e com o reagente metil-N-nitroso-guanidina.
- 3 – Otimização do cultivo de *Erwinia* sp D12, visando a produção de uma glicosiltransferase capaz de converter a sacarose em isomaltulose com alto rendimento.
- 4 – Obtenção de isomaltulose por conversão enzimática da sacarose, utilizando-se a técnica de imobilização da massa celular de *Erwinia* sp D12 em gel de alginato de cálcio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ISOMALTULOSE.

A isomaltulose é também denominada de Palatinose ou Lylose (6-0- α -D glicopiranosil-D-frutose), sendo obtida através da transformação enzimática da sacarose através do uso de glicosiltransferase microbiana. É um dissacarídeo cristalino que apresenta 52% do poder redutor da glicose. Apresenta peso molecular de 360 *daltons* (incluindo a água de cristalização), com rotação específica de (+) 97,2°. Os cristais são semelhantes aos da frutose (Takazoe, 1989). Segundo Cheetham et al. (1985), o ponto de fusão da isomaltulose situa-se na faixa de 118-122°C e de acordo com Takazoe (1989), situa-se entre 122 - 123°C.



Segundo Cheetham et al. (1985), a isomaltulose é um dissacarídeo solúvel em uma concentração de até 37g/100mL de água a 20°C, estável à hidrólise ácida na faixa de pH 2,5-6,0 e não higroscópico. A isomaltulose é prontamente hidrolisada pela enzima maltase-isomaltase (E.C.3.2.1.10), do complexo sacarase-isomaltase localizado no intestino delgado humano, e os monossacarídeos resultantes são metabolizados rapidamente.

De acordo com Cheetham (1987), a isomaltulose pode ser facilmente cristalizada, e é metabolizada por vias similares às da sacarose, possuindo um valor calórico de 4 kcal/g, mas com uma pequena taxa de liberação de monossacarídeos no sangue. Portanto, a necessidade de insulina é menor quando comparado com outros açúcares, criando a possibilidade de aplicações em produtos dietéticos, esportivos e bebidas, sendo também um excelente excipiente em comprimidos. Devido ao fato da isomaltulose ser somente metabolizada pelas células do intestino delgado e por bifidobactérias, a mesma estimula o crescimento destes microrganismos e inibe o crescimento de microrganismos putrefactes, os quais tendem a causar diarreias.

Segundo Koga & Mizutani (1985), e Schiweck et al. (1990), o poder adoçante da isomaltulose é equivalente a 42% do poder da sacarose, enquanto que de acordo com Godshall (1997), a doçura da isomaltulose é cerca de 50% da doçura da sacarose. Inicialmente, percebe-se o poder adoçante mais rapidamente do que o da sacarose; um sabor doce forte similar ao da sacarose persiste e no estágio final um gosto fraco, menos intenso do que o da sacarose permanece.

A solubilidade da isomaltulose à temperatura ambiente é metade da solubilidade da sacarose. Com o aumento da temperatura, a solubilidade aumenta e, a 80°C, é cerca de 85% maior do que a da sacarose. Isto possibilita que alimentos contendo isomaltulose possam ser preparados a temperatura relativamente alta. A viscosidade da isomaltulose é significativamente menor do que a da sacarose na mesma concentração (Koga & Mizutani, 1985).

A isomaltulose e a sacarose não possuem propriedades higroscópicas. Porém, quando os grânulos de sacarose e isomaltulose foram incubados com 1,5 –15,0% de ácido cítrico, Koga & Mizutani (1985) verificaram que somente os grânulos de isomaltulose permaneceram inalterados quanto a higroscopicidade. Não houve também formação de açúcar invertido após 22 dias de incubação da isomaltulose em solução contendo ácido cítrico. Portanto, alimentos acidificados com ácidos orgânicos ou vitamina C, contendo isomaltulose, são mais estáveis do que aqueles que possuem sacarose. A isomaltulose é menos termoestável do que a sacarose, mas é mais resistente aos ácidos.

A isomaltulose não é fermentada pela maioria das bactérias e leveduras. Em bebidas e pães fermentados (ácidos) contendo isomaltulose e sacarose, a isomaltulose permaneceu intacta. Esta propriedade da isomaltulose certamente facilita a manutenção do poder adoçante e do paladar em bebidas e alimentos fermentados (Takazoe, 1989).

A isomaltulose é usada na produção de isomalte, um açúcar-álcool formado por quantidades equimolares de dois isômeros [α -D-glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + α -D-glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)] (Roquette Freres, 2001). O isomalte apresenta um poder adoçante de cerca de 45-60% ao da sacarose em solução aquosa a 20°C. É altamente resistente ao aquecimento, modificações químicas e enzimáticas. Possui ponto de fusão na faixa de 145-150°C, sendo que sua densidade e viscosidade são similares às da sacarose. Em comparação com outros açúcares álcoois, tais como manitol, sorbitol e xilitol, o isomalte tem uma tendência maior para cristalização e menor higroscopicidade. É adequado para diabéticos por ser apenas parcialmente hidrolisado e absorvido no intestino delgado (Bollinger, 1988). Devido a sua baixa higroscopicidade, o isomalte é especialmente utilizado em formulações farmacêuticas, contendo fenilpropanolamina ou benzocaína e isomalte na proporção de 75% p/p, por dissolver vagarosamente mantendo a atividade medicinal por um longo período de tempo (Suedzucker AG et al., 1991). Comprimidos contendo isomalte mantiveram as características físicas relativamente estáveis após um ano de estocagem em diferentes umidades como resultado da sua baixa higroscopicidade (Ndindayino et al., 1999).

O isomalte é um edulcorante e agente de corpo que pode substituir a sacarose na proporção de 1:1. Está disponível em diversas granulometrias, de granular a pó, para distintas aplicações. Pode ser facilmente triturado para obter grânulos de 100 μ m, propriedade que é importante para a fabricação de chocolates e gomas de mascar. O pó finamente granulado pode ser seco para uso como adoçante e pode ser moldado em tabletes (Vissoto & Luccas, 2000). A produção de isomalte é de aproximadamente 20.000-25.000 toneladas/ano e o preço é estimado em US\$ 3/Kg. O consumo de isomalte na Europa corresponde a aproximadamente 15.000 toneladas/ano, nos Estados Unidos 2.000-3000 toneladas/ano e na América do Sul 2.000 toneladas/ano.

Vários produtos de aplicação industrial não alimentícia podem ser preparados a partir de isomaltulose, como por exemplo a isomaltamina, GPA-lactona (α -glicosil (1:5) ácido D-arabinônico), α -GMF (5-glicosiloximetil-furfural), GMF-amina e GMF-ácido. Diversas modificações podem ser promovidas nestas unidades construtivas, originando outros compostos de interesse industrial, tais como detergentes biodegradáveis e surfactantes (Lichtenthaler, 1998). A isomaltulose é transformada em 3-ceto-isomaltulose através da oxidação microbiana, realizada por *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB 396 (Noll-Borchers & Buchholz, 1993; Jan & Hans-Joachim, 1995). Soluções alcalinas de isomaltulose e ácidos carboxílicos insaturados formam copolímeros, que podem ser usados em detergentes (Grillo Werke AG, 1990). A isomaltulose pode ser aminada para isomaltaminas, que pode ser acilada com ácidos carboxílicos insaturados e polimerizada para aminopoliol-N-acril-polímeros, um produto altamente estável à degradação microbiana (Suedzucker, 1994). A isomaltulose pode também ser convertida a 5-(α -D-glicopiranosiloximetil)-furano-2-carboxaldeído por tratamento com coluna de troca iônica fortemente ácida em altas temperaturas. Este derivado pode ser usado como tensoativo (Suedzucker, 1991). Tratando-se a isomaltulose em pH ácido a quente, obtêm-se oligômeros de isomaltulose (IBOs). Estes produtos de condensação podem ser utilizados como agentes estimulantes da proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal, pois não são completamente digeridos pelas células do intestino delgado, atingindo assim o intestino posterior (Kashimura et al., 1996a).

2.1.1. Cariogenicidade da isomaltulose.

Os carboidratos são essenciais na iniciação e progresso da cárie dental. A substituição da sacarose, um açúcar altamente cariogênico, pode ser uma solução no controle e prevenção das cáries, e também útil no controle da diabete e da obesidade.

Roberts & Hayes (1980) sugeriram que a isomaltulose era fracamente cariogênica, pois verificaram que microrganismos obtidos de biofilmes dentários, incluindo *Streptococcus mutans* metabolizavam fracamente a isomaltulose. E, de acordo com Takazoe (1985), dentre os diversos substitutos da sacarose, a isomaltulose demonstrou uma maior redução na produção de ácido lático e na síntese de glucana insolúvel.

A sacarose é fermentada pelo *Streptococcus mutans*, originando biofilmes dentários, compostas principalmente de glucana insolúvel. O *Streptococcus mutans* possui uma glicosiltransferase, que hidrolisa a ligação glicosídica da sacarose, liberando glicose e frutose. Posteriormente, mais de mil moléculas de glicose são unidas formando um polissacarídeo insolúvel, composto de ligações α 1: 3 e α 1: 6, altamente viscoso, que se acumula nas células do *Streptococcus mutans* na superfície dos dentes para formar o biofilme cariogênico. O açúcar fermentável, ao entrar em contato com o biofilme dentário, é completamente decomposto em ácidos, que reduz o pH ao redor do esmalte, causando a cárie (Mitsui Sugar Co., 1987).

A adição de isomaltulose em meios de cultura contendo sacarose reduziu significativamente a produção de glucana insolúvel em água, pelas cepas de *S. mutans* produtoras de glicosiltransferase. A taxa de inibição foi diretamente proporcional à concentração de isomaltulose. A isomaltulose atuou como um receptor da base glicosil originária da sacarose, resultando na formação de uma glucana solúvel em água, impedindo assim a formação de glucana insolúvel (Takazoe, 1989).

Ohta & Takazoe (1983), estudando a produção de ácido láctico pelos biofilmes dentários, verificaram que as mesmas produziram pequena quantidade ou não produziram lactato a partir de isomaltulose, mas houve considerável produção a partir de sacarose e glicose. Dentre as linhagens de *Streptococcus mutans* estudadas, a maior parte delas foi incapaz de fermentar isomaltulose, e as que fermentaram o fizeram muito lentamente. A isomaltulose não serviu como substrato para a síntese de glucana insolúvel em água e inibiu a sua síntese a partir da sacarose. Os autores consideraram a isomaltulose como um açúcar não cariogênico promissor.

Para verificar a cariogenicidade de dietas contendo sacarose, isomaltulose ou mistura destes açúcares, Ooshima et al. (1983a), utilizaram animais experimentais infectados com *Streptococcus mutans* MT8148R (sorotipo C). Após serem sacrificados, os ratos alimentados com uma dieta contendo 56% de sacarose apresentaram formação de biofilmes e indução de cáries notáveis, enquanto que aqueles que se alimentaram de uma dieta contendo isomaltulose mostraram níveis basais de acúmulo de biofilme e incidência

de cáries. A substituição de 50% de sacarose por isomaltulose na dieta resultou em uma redução marcante na incidência de cáries, quando comparada com a dieta contendo 56% de sacarose; já a substituição de apenas 14% não resultou em diferenças significativas. Estes resultados indicam que a redução da incidência de cáries é devida à simples redução de sacarose da dieta, e não devido ao efeito anticariostático da isomaltulose.

Em estudos posteriores, Ooshima et al. (1983b) verificaram que o *Streptococcus mutans* 6715 presente em ratos infectados não utilizaram a isomaltulose e produziram uma quantidade insignificante de ácidos. Constataram também que o *Streptococcus mutans* sorotipos A, D e G não fermentaram a isomaltulose; já os sorotipos B, C, E ou F fermentaram, e a síntese de glucana insolúvel diminuiu significativamente na presença de isomaltulose.

Cepas representativas de cada sorotipo de *Streptococcus mutans* também foram usadas por Takazoe (1989), para testes fermentativos, utilizando-se meios de cultura contendo 1% de isomaltulose e, para o controle, 1% de glicose. Todas as cepas de *S. mutans* sorotipos A, D e G e uma do sorotipo E não desenvolveram no meio contendo isomaltulose, e o pH permaneceu inalterado. Os valores de pH dos meios de cultura contendo glicose e cultivados com todas as cepas estudadas situou-se entre 4,1 e 4,8.

Para verificar a cariogenicidade da isomaltulose, Sasaki et al. (1985) utilizaram ratos infectados com *Streptococcus mutans* E-49 e alimentados com dieta Keyes 2000 contendo isomaltulose 56%. Os resultados obtidos demonstraram que a isomaltulose foi significativamente menos cariogênica do que a sacarose, diminuindo a incidência de cáries, mas não interferindo no ganho de peso do animal e nem provocando distúrbios gastrointestinais.

Vários autores (Topitsoglou et al., 1984; Ziesenitz & Siebert, 1987; Takazoe, 1989) verificaram uma diminuição significativa na produção de ácidos e de glucanas insolúveis por microrganismos do biofilme dentário humano, após a ingestão de isomaltulose, em comparação com a ingestão de sacarose, sugerindo que a isomaltulose é menos cariogênica do que a sacarose.

Em estudos experimentais de cáries, Takazoe (1989) verificou que, quando 17,5% de isomaltulose foram incluídos na dieta contendo 38,5% de sacarose, houve uma redução da incidência de cáries.

A produção de ácido em suspensões de biofilmes dentários foi menor a partir de isomaltulose do que a partir de sacarose, seguida de sorbitol e xilitol, demonstrando que os microrganismos presentes no biofilme dentário fermentaram isomaltulose mais lentamente do que a sacarose. Portanto, a isomaltulose pode ser usada como um substituto da sacarose por reduzir a incidência de cáries e por ser atóxica e bem tolerada (Maki et al., 1983).

Em um estudo *in vitro*, Bibby & Fu (1985), compararam a capacidade do biofilme dental natural de seres humanos em converter adoçantes tais como isomaltulose, xilitol, sacarina, licasin, sorbitol, manitol, isomalte, sorbose e aspartame em ácidos. Os adoçantes foram utilizados em três concentrações diferentes (0,1%, 1,0% e 10,0%), e observou-se que a isomaltulose, ao ser metabolizada, resultou num menor valor de pH, seguida por licasin, manitol, isomalte, sorbitol e sorbose, sendo que o xilitol, sacarina e aspartame, nas concentrações mais altas, mostraram um valor de pH mais alto, ao contrário do que aconteceu com os outros adoçantes testados. A formação de ácidos a partir da sacarose foi influenciada por todos os adoçantes testados.

Um método para reduzir a formação de biofilme dentário, causado por *Streptococcus mutans*, foi descrito por Tate & Lyle (1986), o qual sugere a substituição de parte da sacarose utilizada na manufatura de produtos não alcoólicos para consumo humano e animal por isomaltulose.

Ao comparar a utilização de alguns substitutos da sacarose por linhagens de microrganismos formadores de biofilmes dentários, Minami et al. (1990) verificaram que todas as linhagens de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, independentemente do sorotipo, produziram quantidades insignificantes de ácidos a partir de isomaltulose, trealulose, turanose e maltulose, o que não ocorreu a partir da sacarose. Os substitutos da sacarose não foram utilizados como substrato para a glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e apresentaram um efeito inibitório na síntese de glucana insolúvel a partir da sacarose, sendo que os valores de K_m e a $V_{máx}$ aumentaram na presença

de isomaltulose. A aderência do *Streptococcus mutans* à superfície de vidro não foi inibida pelos substitutos da sacarose, mas a do *Streptococcus sobrinus* 6715 foi, exceto pela turanose.

Ooshima et al. (1990) sugeriram que a isomaltulose é um substituto promissor da sacarose, pois em um estudo com 15 voluntários submetidos a uma dieta e higiene oral controlada, verificou-se uma redução no índice de biofilme dentário e diminuição de *Streptococcus mutans* na saliva a níveis abaixo do basal, após a ingestão de isomaltulose, em comparação com a ingestão de sacarose.

Estudando o efeito da trealulose e da isomaltulose na indução de cáries dentárias em ratos infectados por *Streptococcus mutans*, Ooshima et al. (1991) constataram que uma dieta contendo 56% de isomaltulose induziu a uma formação insignificante de cáries, e que o índice de placa foi menor do que nos animais alimentados com os outros açúcares. A isomaltulose e a trealulose inibem moderadamente a atividade de glicosiltransferase do *Streptococcus mutans*.

A isomaltulose, devido a sua baixa cariogenicidade, é um açúcar alternativo para substituir os açúcares acidogênicos e reduzir a incidência de cáries dentais em produtos de confeitaria, e o isomalte é um substituto da sacarose em produtos dietéticos como balas, caramelos, gomas de mascar, chocolates, sorvetes, geléias, bolos, bebidas etc.

Lotte Company Limited (1990), descreveu uma patente de produção de leite condensado adoçado com isomaltulose e xarope de isomaltulose, menos cariogênico, de sabor doce e com propriedades físicas equivalentes ao leite condensado contendo sacarose. O produto apresentou boas características durante armazenamento, sem cristalização da isomaltulose.

O uso disseminado de açúcares substitutos e de dentifrícios fluoretados tem sido sugerido como o principal fator de redução de cáries em crianças finlandesas e suíças. Lingstrom et al. (1997) sugeriram a associação de isomaltulose e xilitol como uma combinação promissora na redução de cáries dentárias, pois tal mistura reduz dificuldades

técnicas e médicas, uma vez que o xilitol sozinho induz a alterações estomacais em pessoas sensíveis, e a isomaltulose não, e o xilitol compensa o nível de doçura da isomaltulose.

De acordo com Peltroche et al. (2001), o potencial anticariogênico da isomaltulose e leucrose foi determinado através de estudos baseados principalmente no metabolismo do *Streptococcus mutans*. Devido ao fato da cavidade oral possuir uma microbiota diversificada, os autores realizaram um estudo comparativo da produção de ácidos a partir glicose, sacarose, isomaltulose ou leucrose, utilizando 44 espécies de bactérias e 30 de leveduras. Somente *Lactobacillus* spp., *Stomatococcus mucilaginosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella paramesenteroides*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae* utilizaram leucrose e isomaltulose. *Stomatococcus mucilaginosus* produziu um polissacarídeo insolúvel na água através da fermentação de leucrose e isomaltulose. A hidrólise extracelular destes açúcares por microrganismos autóctonos, produz glicose e frutose que podem ser utilizadas por microrganismos que causam cárie. Portanto, o potencial anticariogênico dos substitutos da sacarose em alimentos pode ser limitado.

2.1.2. Digestão e absorção da isomaltulose.

Dissacarídeos tais como sacarose, isomaltose, maltose, maltotriose e isomaltulose são hidrolisados pelo complexo sacarase-isomaltase localizado nas células intestinais. Os monossacarídeos assim formados são eficientemente absorvidos por transporte ativo para suprir o sistema portal (Cheetham, 1982).

O complexo sacarase-isomaltase, menos comumente denominado de complexo sacarase-dextrinase, é uma glicoproteína intrínseca, multifuncional, composta de enzimas maltase-isomaltase (E.C.3.2.1.10), as quais hidrolisam maltose, isomaltose, isomaltotriose, isomaltulose, oligo-(1,6)-glicosídeos e oligo-(1,4)-glicosídeos, e a maltase-sacarase (E.C.3.2.1.48), que por sua vez hidrolisa sacarose, maltotriose, maltose e α -(1,4) glicosídeos. O complexo é encontrado principalmente no jejuno e íleo proximal, estando completamente ausente no estômago e cólon. As atividades são geralmente maiores na porção distal das vilosidades, e cada subunidade do complexo enzimático age independentemente sobre o seu respectivo substrato (Cheetham, 1982).

Dahlqvist et al. (1963), verificaram que a hidrólise da isomaltulose parece ser catalisada somente pela isomaltase, e a intolerância de alguns indivíduos à isomaltulose era devido a falta da isomaltase intestinal. De acordo com Cheetham (1982), uma deficiência recessiva autossômica do complexo enzimático sacarase-isomaltase ocorre em uma porcentagem pequena de seres humanos, principalmente em crianças que são intolerantes aos açúcares hidrolisados por este complexo. Os sintomas, tais como diarreias, são menos severos do que aqueles causados por intolerância a lactose. A produção de isomaltulose em grande quantidade tornaria o teste de intolerância a isomaltulose uma técnica útil para averiguar a deficiência intestinal da isomaltase.

Hertel et al. (2000), estudaram a habilidade das enzimas sacarase-isomaltase e glicosidase-maltase intestinais de suínos purificadas para hidrolisar di e oligossacarídeos contendo resíduos de glicose e frutose e seus correspondentes açúcares-álcoois. O sítio ativo da subunidade sacarase hidrolisa as ligações glicosídicas α , β (1:2) e a enzima apresenta grande afinidade para dissacarídeos. Oligossacarídeos e oligossacarídeos reduzidos contendo ligações α (1:6) e α (1:1) são hidrolisados pela isomaltase, sendo que foram postulados mais de dois subsítios para esta subunidade. Açúcares-álcoois são fracamente hidrolisados. Glicosidase-maltase apresenta uma baixa taxa de hidrólise para ligações α (1:1).

Em um estudo de biodisponibilidade da isomaltulose em ratos, McDonald & Daniel (1983), verificaram que, em uma dieta contendo 20% de isomaltulose, a mesma foi quase totalmente hidrolisada no duodeno em glicose e frutose, que foram reabsorvidas. Segundo os autores, a ingestão da isomaltulose não provoca nenhum tipo de distúrbio gastrointestinal.

Kawai et al. (1985), verificaram que a velocidade de hidrólise da isomaltulose é menor do que a da sacarose, e que sua absorção é mais lenta. Quando 50 g de isomaltulose foram administradas em 8 voluntários normais, o nível de glicose plasmática aumentou gradualmente para $110,9 \pm 4,9$ mg/dL após 60 minutos, mantendo-se neste nível por 120 minutos. A concentração de glicose plasmática em resposta a 50 g de sacarose no mesmo grupo foi de $143,0 \pm 08,8$ mg/dL, após 30 minutos de administração, diminuindo

posteriormente para os níveis normais. A concentração plasmática de insulina após a ingestão de isomaltulose foi significativamente menor do que a obtida após administração de sacarose. Os autores sugeriram que a diferença se deve à digestibilidade mais lenta da isomaltulose quando comparada com a da sacarose, de forma que sua absorção também ocorrerá mais lentamente. Os autores também sugeriram que a isomaltulose poderia ser utilizada como adoçante para pacientes diabéticos. Segundo Kashimura et al. (1996a), a digestibilidade da isomaltulose corresponde a 1/5 da sacarose.

Para estudar o efeito de isomaltulose, lactose, isomalte e oligômeros baseados em isomaltulose (IBOs) que consistem de uma mistura de isomaltulose (50,5%) e seus condensados (6,2% octassacarídeos, 12,9% hexassacarídeos, 28,4% tetrassacarídeos e 2% de monossacarídeos) na absorção e retenção de cálcio, magnésio, fósforo e ferro, Kashimura et al. (1996b), utilizaram ratos Wistar machos de 4 semanas de idade, divididos em 5 grupos de 6 ratos cada. Os animais foram alimentados à vontade por 16 dias com uma dieta basal contendo 5% de isomaltulose, 5% de lactose e 5% de isomalte ou IBOs. Após uma semana, os animais foram submetidos a um estudo de balanço dos minerais. O fornecimento de isomalte bem como de IBOs aumentou significativamente a absorção e retenção dos minerais, mas o fornecimento de isomaltulose não intensificou o processo. O conteúdo dos ácidos orgânicos foram aumentados pelo fornecimento de IBOs ou isomalte, não ocorrendo alterações do pH e acidez. A adição de ácido acético e butírico no segmento do intestino posterior *in vitro* intensificou a absorção de cálcio, magnésio e fósforo.

Kashimura et al. (1996b), verificaram que os oligômeros de isomaltulose aumentam a retenção de minerais, principalmente em ratos com deficiência de cálcio, e que existe uma relação entre a absorção de minerais e os ácidos graxos de cadeia pequena produzidos a partir de sacarídeos pelas bactérias intestinais.

O fornecimento de isomaltulose em níveis dietéticos de até 10%, para ratos Wistar fêmeas entre o período de 0 a 21 dias de gestação, não provocou toxicidade materna e não interferiu no desempenho reprodutivo e no desenvolvimento embrionário ou fetal, incluindo exames das vísceras e do esqueleto. O nível de isomaltulose 10% na dieta foi equivalente a cerca de 7 g/kg de peso vivo por dia (Lina et al., 1997).

2.2. PRODUÇÃO DA ISOMALTULOSE.

A isomaltulose é um açúcar alternativo obtido através da conversão enzimática da sacarose pela enzima glicosiltransferase. O primeiro registro desta enzima foi do microrganismo *Protaminobacter rubrum*, o qual foi isolado por Weidenhagen e Lorenz e identificado por Windish em 1958.

A isomaltulose é obtida através da isomerização ou transglicosilação da sacarose, utilizando-se células de microrganismos viáveis ou mortas imobilizadas ou com a enzima extraída, na forma livre ou imobilizada.

Sharpe et al. (1960), durante o estudo de formação de dextrana a partir da sacarose, usando preparações de *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL B-512F), isolaram dois novos açúcares como sub-produtos, sendo identificados como leucrose e isomaltulose.

Linhagens de *Protaminobacter rubrum* (Mauch & Schmidt-Berg-Lorenz, 1964, citados por McAllister et al., 1990), *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (Lund & Wyatt, 1973), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1982), *Serratia plymuthica* (Fuji et al., 1983), (McAllister et al., 1990), *Klebsiella* sp (Uekane, 1993) e *Erwinia* sp D12 (Celestino, 1998) têm sido descritas na literatura para a conversão de sacarose em isomaltulose.

As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, da linhagem *Erwinia* sp D12 são ilustradas no Quadro 1 de acordo com Celestino (1998).

QUADRO 1. Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da linhagem *Erwinia* sp D12.

	Linhagem <i>Erwinia</i> sp D12
Bastonete Gram	-
Produção de Indol	-
H ₂ S em meio de TSI	-
Teste de Voges Proskauer	+
Teste de Vermelho de Metila	-
Citrato	+
Nitrato	+
Oxidase	-
Catalase	+
Urease	-
Ornitina descarboxilase	-
Arginina descarboxilase	+
Lisina descarboxilase	-
Fenilalanina desaminase	+
Liquefação da gelatina	-
Formação de ácidos a partir de:	
Arabinose	+
Glicose	+
Inositol	-
Lactose	-
Maltose	+
Manitol	+
Sorbitol	+
Sacarose	+
Xilose	+
Utilização de Oxigênio	Anaeróbia facultativa

A glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 é uma enzima intracelular, produzida na fase exponencial de crescimento (Celestino, 1998).

De acordo com Cheetham et al. (1982) e Bornke et al. (2001), a significativa adaptação da *Erwinia rhapontici* para a formação de isomaltulose não é clara, podendo ser um método irreversível de seqüestrar energia e carbono em uma forma menos viável, para a planta hospedeira e para outros microrganismos que poderiam concorrer com a *Erwinia rhapontici* pela sacarose.

Para a produção de isomaltulose Suddeutsche Zucker (1974), utilizou a massa celular de microrganismo produtor de glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose, em contato com uma solução de sacarose entre 20 e 25% em temperaturas de 20 a 37°C, sob contínua passagem de ar e agitação. A conversão de 90% de sacarose em isomaltulose ocorreu dentro de 12 horas.

Cheetham et al. (1982), descreveram a bioconversão de sacarose para isomaltulose pela bactéria *Erwinia raphontici*. Os autores relataram que a enzima responsável pela formação de isomaltulose é a glicosiltransferase, que não requer cofatores ou íons e está localizada no espaço periplásmico, sendo sacarose-específica, cujo mecanismo intramolecular usa somente a glicose e frutose derivadas da sacarose. Esta enzima é mais ativa em pH 7,0 e a 30°C, e apresenta valor de K_m em relação ao substrato sacarose igual a 0,35 M. A adição de nitrogênio, nutrientes ou outros açúcares na solução do substrato sacarose não aumentou a atividade da enzima. Os pesquisadores verificaram a formação de ácidos e de um dissacarídeo, possivelmente 1-0- α -D-glicosilfrutose, como subprodutos durante a fermentação da sacarose. As células imobilizadas foram 350 vezes mais estáveis do que as células livres, apresentando uma meia vida de 8600 horas.

Cheetham et al. (1985) relataram a produção de isomaltulose utilizando células de *Erwinia raphontici* imobilizadas. A conversão máxima de sacarose para isomaltulose ocorreu quando o substrato foi ajustado para pH 7,0 com NaOH 0,1 M e a 30°C. Foi observado que, além de isomaltulose, havia também a formação de subprodutos, embora em pequenas quantidades, principalmente trealulose (1-O- α -D-glicopiranosil- α -D-frutofuranosídeo). Otimizando-se as condições de imobilização de células e enzimas, como por exemplo a glicosiltransferase, pode ocorrer uma produção de cerca de 1500 vezes o seu próprio peso de isomaltulose durante uma meia vida de uso por um ano. A síntese de isomaltulose envolveu os seguintes passos: transferência do substrato do volume inicial para a superfície das partículas biocatalíticas, difusão do substrato para as células imobilizadas através dos poros das partículas, seguida pela transferência do substrato através da membrana e parede da célula imobilizada.

Fuji et al. (1983), descreveram o isolamento e caracterização de oligossacarídeos produzidos a partir de sacarose por ação da bactéria *Serratia plymuthica* NCIB 8285 e verificaram, através da análise por cromatografia líquida de alta pressão, que a isomaltulose era o principal produto formado na reação, correspondendo a 21,8% do total. A partir da identificação dos outros oligossacarídeos, os autores concluíram que a enzima de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 atuava na transferência de resíduos α -glicosil para grupo OH do carbono 1 ou 6 da molécula de frutose ou para grupo OH do carbono 6 da molécula de glicose.

McAllister et al. (1990), verificaram que a conversão de sacarose para isomaltulose através da enzima glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* é influenciada pelo tempo de incubação e concentração de substrato. Os autores utilizaram soluções de sacarose de 5, 10 e 40% em tempos de incubação variados de 10, 60 e 180 minutos e, constataram, que a maior conversão (87%) ocorreu após 3 horas de incubação com solução de sacarose 40%.

De acordo com Meito Sangyo Kabushiki Kaisha (1990), certas linhagens do gênero *Klebsiella*, tais como *Klebsiella terrigena* JCM 1687 [Japan Collection of Microorganisms Sectin Riken (The Institute of Physical and Chemical Research)] e *Klebsiella* sp nº 88, possuem excelente habilidade para produzir glicosiltransferase e, conseqüentemente, converter sacarose para isomaltulose. Particularmente, a *Klebsiella* sp nº 88 possui excelente habilidade na conversão de carboidratos sem a produção de monossacarídeos como subprodutos.

Tsuyuki et al. (1992), isolaram linhagens de *Klebsiella planticola* e *Klebsiella terrigena* de amostras do solo na Tailândia. A linhagem de *K. planticola* MX-10 imobilizada em esferas de alginato de cálcio tratadas com polietilenimina e glutaraldeído, produziu 65,5% de isomaltulose e 29,7% de trealulose, quando 98% de sacarose foi transformada.

Uekane (1993), purificou a enzima intracelular de *Klebsiella* sp, uma glicosiltransferase que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose e pode ser classificada como E.C.2.4.1_ hexosiltransferase. A produção máxima foi obtida após 24 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de

peptona e 0,4% de extrato de carne, ajustado para pH 6,5. A enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 5,5 a 6,6 em tampão citrato fosfato, sendo termosensível, e apresenta peso molecular de 74.000 daltons, estimado através de filtração em gel Sephadex G-200. A conversão máxima de sacarose em isomaltulose foi de 86% quando a enzima foi incubada com solução contendo 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,5 a 25°C por 64 horas. Os valores de K_m e V_{max} da glicosiltransferase foram, respectivamente, 120 mM de sacarose e 0,090 mol de isomaltulose/min/mg de proteína.

Egerer (1994), estudando a produção de isomaltulose a partir da enzima sacarose mutase de *Protaminobacter rubrum*, verificou que o tempo ótimo de fermentação, no qual a enzima apresentou maior atividade, foi de 8 horas, na fase logarítmica de crescimento celular. Isto pode ser explicado pela formação periplásmica da sacarose mutase durante o crescimento celular e pela mudança estrutural das proteínas nas fases finais de crescimento e nas células velhas.

Bando & Sato (1997), estudando a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia sp* D12 em diferentes meios de cultura, obtiveram maior produção de glicosiltransferase (6,67 unidades de atividade/mL do meio de cultura) em um meio constituído de 1% de peptona, 0,1% de extrato de carne, 0,3% de cloreto de sódio e 10% de melaço (6% de açúcares redutores totais), após 15 horas de fermentação a 30°C.

Segundo Celestino (1998), a enzima glicosiltransferase intracelular de *Erwinia sp* D12 que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose possui atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C, é termosensível sendo inativada após 1 hora de tratamento a temperaturas superiores a 39°C e após 3 horas a 35°C na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3 após 24 horas de incubação a 5°C. Os valores de K_m e V_{max} da enzima purificada foram respectivamente, 138mM de sacarose e 9,81 μ mol de isomaltulose/minuto/mg de proteína. Possui peso molecular estimado em 63.000 daltons através da filtração em gel Sephadex G-200. A atividade de glicosiltransferase não foi afetada por KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, Na₂HasO₄ na concentração 10mM, em relação ao volume final da mistura de reação, enquanto que os sais de CoCl₂, ZnCl₂, FeCl₃ e CuSO₄ não afetaram sua atividade nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM. Os sais MnCl₂, BaCl₂ e

$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na concentração de 0,1mM não inibiram a atividade de glicosiltransferase. A atividade residual de glicosiltransferase na presença de MnCl_2 nas concentrações 1mM e 10mM, foi respectivamente 93,0% e 73,7%, enquanto que na presença de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, nestas concentrações, a atividade residual foi 98,3% e 93,3%. O sal de AgNO_3 inibiu cerca de 37% a atividade de glicosiltransferase na concentração de 0,1 mM e inibiu completamente na concentração 1,0mM, enquanto que o HgCl_2 inibiu completamente a enzima na concentração 1mM em relação ao volume final de reação. No estudo da aplicação da glicosiltransferase na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se solução 5% e 10% de sacarose foram obtidos rendimento de 73,5% e 72,3% de isomaltulose respectivamente, após 4 horas de reação a 40°C.

Huang et al. (1998), verificaram que em condições ideais a *Klebsiella planticola* CCRC 19112 converteu sacarose em isomaltulose e trealulose. A taxa de conversão foi de 80% de isomaltulose e 15% de trealulose em 4 horas de incubação. Os autores testaram glicose, maltose, lactose, isomaltose, frutose e sacarose como fonte de carbono e bacto-peptona, bacto-triptona, caseína, farinha de feijão, sulfato de amônia, cloreto de amônia e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. A sacarose e triptona foram as fontes mais efetivas de carbono e nitrogênio para a produção de células com alta habilidade para formar isomaltulose, e os sais inorgânicos testados (cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio, carbonato de sódio, fosfato ácido de potássio e fosfato ácido de sódio) não apresentaram um efeito significativo. A enzima purificada utilizou eficientemente sacarose como substrato, mas não usou isomaltulose, trealose, lactose, maltose, rafinose e glicose mais frutose.

Tate & Lyle (1981), estudaram a produção de isomaltulose, utilizando *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 imobilizada em gel de alginato. O experimento foi conduzido utilizando-se células em fase estacionária de crescimento, as quais foram imobilizadas em uma concentração de células de 20% (p/v) em alginato de cálcio 5%. A suspensão de células foi mantida a 30°C e adicionou-se 20% de sacarose, a qual serve para estabilizar o sistema enzimático. As esferas obtidas foram colocadas em uma coluna de 30 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro. Uma solução de sacarose 55% foi bombeada através da coluna a um fluxo de aproximadamente 0,01 ecv/h (volume da coluna por hora) e a

temperatura da coluna mantida a 30°C. Após 24 horas de reação, a atividade das células imobilizadas foi de 0,2 g de produto/ g de células úmidas/ hora, e a estabilidade, cerca de 1 ano. Posteriormente, o eluato da coluna foi evaporado a 70% (p/v) a 60°C e, em seguida resfriado para a obtenção dos cristais, os quais foram coletados por centrifugação e analisados. Os cristais apresentaram cerca de 94,5 % de isomaltulose, com uma molécula de água, sendo que através de 3 recristalizações obteve-se cristais puros de isomaltulose. Os autores também estudaram, nas condições experimentais acima citadas, a influência da concentração da sacarose (12,5 a 60%) na atividade e estabilidade da célula imobilizada. Verificou-se que concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40%) afetam a atividade da célula imobilizada devido ao efeito inibitório, mas aumentam nitidamente a estabilidade da mesma. Portanto, o aumento na estabilidade da célula imobilizada com o aumento da concentração da sacarose compensa a diminuição da atividade, uma vez que a produtividade da coluna aumentou. Alta concentração de sacarose favorece o equilíbrio entre isomaltulose e sacarose, reduz a formação de gases e ácidos como subprodutos, reduz a atividade de proteases endógenas, tende a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

Segundo Cheetham (1987), o aumento da estabilidade das células imobilizadas em função do aumento da concentração de sacarose pode ser devido a estabilização pelo produto ou pelo produto e substrato e pela imposição de restrições difusionais no suprimento de substrato para as células imobilizadas. A estabilidade também pode estar relacionada com a baixa taxa de metabolismo endógeno das células ou com a sua plasmólise promovida pela alta concentração de sacarose. A pureza da sacarose utilizada também é um fator importante, uma vez que tanto a atividade quanto a estabilidade foram reduzidas, quando utilizou-se sacarose impura.

Sddeutsche Zucker-Aktiengesellschaft (1987), obteve uma produção de 82% de isomaltulose, 1% de glicose, 4% de frutose e 13% de 1-O- α -D-glucopiranosídeo-D-frutose, quando utilizou células de *Protaminobacter rubrum* (CBS 547.77) mortas e imobilizadas em alginato de cálcio. A solução de sacarose utilizada foi de 65 a 75% e na temperatura de 40 a 60°C, sendo a taxa de fluxo ajustada para permitir um tempo de contato

entre 4 a 7 horas, ou seja, que correspondesse a 0,4–0,6 g de sacarose por g de célula imobilizada por hora. O uso de células mortas aumentou a produção de isomaltulose, uma vez que a sacarose não é utilizada pelo metabolismo celular. De acordo com Cheetham (1987), a formação de isomaltulose também é mais eficiente utilizando-se células em não crescimento, sendo que altas concentrações de substratos podem ser usadas, as quais são inibitórias ao crescimento celular. Nestas condições, a energia necessária para a agitação, aeração e manutenção da esterilidade é reduzida, e pequena quantidade de substrato é desviado para o crescimento celular e menos resíduos são produzidos.

Utilizando-se células imobilizadas de *Serratia plymuthica*, Fujii et al. (1983) detectaram através de cromatografia líquida de alta eficiência, 15,9% de frutose, 9,7% de glicose, 21,8% de sacarose, 16,6% de trealulose, 21,8% de isomaltulose, 5,2% de isomaltose e 8,2% de isomelezitose, a partir do substrato sacarose.

Veronese & Perlot (1998), estudando o mecanismo bioquímico que ocorre no sítio ativo das enzimas sacarose isomerase, produzidas por *Serratia plymuthica*, *Protaminobacter rubrum* e *Erwinia rhapontici*, verificaram que a produção de isomaltulose a partir da sacarose gerava também trealulose, isomaltose, isomelezitose, glicose e frutose e que a distribuição dos produtos era dependente da temperatura e da adição de glicose e frutose na reação, sendo proposto um mecanismo intra e intermolecular. A adição de frutose na reação leva a uma adicional produção de trealulose, devido a transferência de glicose para frutopiranosse exógena. Contudo, frutofuranose pode ser também um aceptor, aumentando ligeiramente a produção de isomaltulose. Em trabalhos anteriores, os autores demonstraram que a glicose é um inibidor competitivo da sacarose.

Showa Denko Kabushi Kaisha (1989), estudou a produção de isomaltulose a partir de soluções contendo glicose e frutose e exoenzimas que hidrolisam ligações glicosídicas α 1:4 e α 1:6. O autor testou glicoamilase de *Aspergillus niger*, isomaltase de leveduras e β -amilase de cevada na presença de 10% de glicose e 30% de frutose, obtendo-se 46%, 17% e 15% de isomaltulose, respectivamente, em relação a glicose adicionada. A formação de isomaltulose a partir de glicose e frutose em comparação com a sacarose é desvantajosa do ponto de vista de equilíbrio da reação, pois com a sacarose o equilíbrio tende para a

formação da isomaltulose. Devido a mistura de glicose e frutose ser economicamente e comercialmente viável na forma de HFS (“xarope de alta concentração de frutose”), um processo para a produção de isomaltulose a partir da mistura de glicose e frutose, tais como HFS ou açúcares invertidos, poderá ser comercialmente vantajoso.

É bem conhecido que a isomaltulose é um açúcar não cariogênico e, recentemente, foi também demonstrado *in vivo* e *in vitro* que a trealulose possui propriedades não cariogênicas. Este fato tem levado ao uso de um xarope contendo trealulose e isomaltulose, denominado de “xarope de isomaltulose”. Mitsui Sugar Co. & Suedzucker AG (1992), verificaram que o processo de conversão de sacarose para isomaltulose e trealulose é influenciado pela temperatura de conversão. Utilizando-se 25g de α -glicosiltransferase imobilizadas de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 em uma coluna de 15 mm de diâmetro e 300 mm de comprimento, com uma solução de sacarose 50% em um fluxo de 8,5mL/h a 15°C, 25°C e 35°C, obteve-se 8,7%, 16,2% e 18,0% de isomaltulose e 89,7%, 82,0% e 80,0% de trealulose, nas respectivas temperaturas, demonstrando que com o aumento da temperatura houve uma maior produção de isomaltulose e uma diminuição na produção de trealulose. Nagai et al. (1994), verificaram que a adição de 5% de glicose na transformação enzimática de 20% de sacarose em trealulose e isomaltulose pela enzima α -glicosiltransferase purificada de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 diminuiu a taxa de reação, mas não alterou a composição dos produtos, e a adição de 5% de frutose não modificou nenhum dos dois fatores. A taxa inicial de produção de trealulose-isomaltulose foi a mesma com 20% e 25% de sacarose. Glicose e lactose inibiram a reação, mas o efeito inibitório foi maior pelos reagentes e metais testados, principalmente pelo mercúrio.

Nagai-Miyata et al. (1993), verificaram que a produção de trealulose por uma linhagem de *Agrobacterium radiobacter* MX-232 foi de 88-90% (p/p), quando utilizou-se células livres e solução de sacarose 20% (p/p), e de 85% quando utilizou-se células imobilizadas e solução de sacarose de 40-50% (p/p) como substrato, obtendo-se assim um resultado satisfatório com a utilização de células imobilizadas.

Xyrofin Oy (2000a), utilizou células viáveis de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapontici* imobilizadas em um material de troca de ânion

fracamente básico sob a forma de dietilaminoetil-celulose modificada (DEAE-celulose) que inclui microfibras ou micropartículas aglomeradas com poliestireno, para promover a isomerização da sacarose em isomaltulose. Os autores verificaram que a conversão é influenciada pela temperatura, concentração de sacarose e pelo fluxo da sacarose através da coluna. Os melhores resultados com células de *Protaminobacter rubrum*: isomaltulose 79%, trealulose 0,9%, frutose 0,4%, glicose 0,6% e sacarose 18,5%, foram obtidos quando utilizou-se solução de sacarose 25% a 30°C e com um fluxo de 0,08 volume do leite por hora. A coluna foi mantida por duas semanas e a conversão diminuiu em função do tempo. As células imobilizadas foram restauradas pela alimentação da coluna com um meio de cultivo estéril fresco e, após um mês de uso, o veículo de DEAE-celulose foi regenerado através da lavagem das células de *Protaminobacter rubrum* imobilizadas com NaOH 1M (60°C) até que a cor original do veículo fosse alcançada; posteriormente, lavou-se com água, tamponou-se a um pH 5 e, finalmente, lavou-se com água estéril. Após a análise por HPLC dos eluentes das colunas contendo células imobilizadas, verificou-se que as células de *Serratia plymuthica* produziram: isomaltulose 80%, trealulose 7,5%, frutose 5,5%, glicose 3% e que as de *Erwinia rhapontici* produziram: isomaltulose 79%, trealulose 15%, frutose 0,5% e glicose 0,5%, quando utilizou-se uma solução de sacarose a 25% a 30°C com um fluxo de 0,12 e 0,02 volume do leite por hora, respectivamente. Pode-se usar várias colunas conectadas em série e/ou em paralelo, por exemplo, para permitir que uma coluna seja submetida à regeneração, enquanto que as outras estão em operação. A solução de sacarose pode também ser recirculada através de uma ou várias colunas para aumentar a conversão.

Xyrofin Oy (2000b), descreveu a obtenção simultânea de açúcares e não açúcares convertidos e não convertidos tais como isomaltulose, trealulose, açúcares invertidos e betaina (composto de amônio quaternário). Utilizou-se o melão de cana-de-açúcar, para a obtenção de açúcares invertidos e produção de isomaltulose e trealulose, através de transglicosilação da sacarose presente no melão pelas células de *Protaminobacter rubrum*. Utilizou-se melão de beterraba para a obtenção de betaina e produção de isomaltulose e trealulose. O melão de beterraba possui 50-70% (sólidos secos) de sacarose e 3-8% de betaina, e o melão de cana-de-açúcar possui 35-55% de sacarose e 10-35% de açúcares invertidos. O melão tem sido empregado como um excelente nutriente para o crescimento

de microrganismo em preparações de suspensões celulares, utilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose. No referido trabalho, o melaço foi usado como uma fonte apropriada de sacarose para a produção de isomaltulose e/ou trealulose.

De acordo com Leitner et al. (2001), a partir da oxidação da isomaltose pela enzima piranose 2-oxidase de basidiomicetos *Trametes multicolor* forma-se a isomaltosona que, posteriormente, pode ser reduzida pela aldose redutase de levedura *Candida tenuis* resultando na formação de isomaltulose com alto rendimento.

Atualmente produz-se em escala industrial cerca de 35.000 toneladas/ano de isomaltulose por isomerização da sacarose, utilizando-se células de *Protaminobacter rubrum* (Leitner et al., 2001).

2.3. OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES.

Os microrganismos isolados podem ser submetidos a processos de mutação genética, visando a obtenção de cepas mutantes com maior atividade enzimática que as cepas parentais.

Os métodos de mutação convencional usados são a radiação ultravioleta e reagentes como o metil-N-nitroso-guanidina e etil metano sulfonado.

A incidência de radiação ultravioleta na célula microbiana, promove uma condensação de 2 grupos etileno formando um anel ciclo butano ou um dímero ciclo butano da timina entre 2 resíduos de timina da mesma fita, formando uma curvatura ou enroscamento da fita de DNA. A irradiação e passos subsequentes devem ser realizados no escuro para prevenir a fotoreativação, pois os dímeros de pirimidina são convertidos diretamente às pirimidinas monoméricas pela enzima DNA fotoliase, que utiliza a energia derivada da luz absorvida devido a presença de dois cofatores cromóforos (FADH₂ e folato) (Lehninger et al., 1995).

A indução de mutação, provocada pelos reagentes metil-N-nitroso-guanidina e etil metano sulfonado é devido, respectivamente, a um processo de desaminação das bases nitrogenadas (adenina/hipoxantina, citosina/uracil e guanina/xantina) e metilação da

guanina/O⁶metil guanina, alterando a sequência das bases nitrogenadas das futuras gerações (Lehninger et al., 1995).

Marancenbaum & Park (1979), obtiveram uma cepa mutante de uma bactéria produtora de penicilina amidase, através do tratamento da cepa parental com o reagente metil-N-nitroso-guanidina. A cepa mutante obtida apresentou cerca de 220% mais atividade enzimática quando comparado com a cepa original.

Uma cepa mutante de *Aspergillus awamori*, obtida após tratamento com o reagente metil-N-nitroso-guanidina, apresentou 100% mais atividade de amiloglicosidase do que a cepa original. Esta cepa apresentou-se morfológicamente idêntica a cepa inicial, sendo posteriormente, submetida a radiação ultravioleta. O mutante obtido após radiação ultravioleta, produziu menos conídeos quando comparado com a cepa parental e a cepa obtida do tratamento com metil-n-nitroso-guanidina, entretanto a produtividade de amiloglicosidase foi similar a do mutante inicial (Park & Santi, 1977).

Tate & Lyle (1981), estudando a produção de isomaltulose através de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 e objetivando um aumento da produção da enzima glicosiltransferase a partir deste microrganismo, utilizou o reagente mutagênico metil-N-nitroso-guanidina. Os autores verificaram que as linhagens mutantes produziram menor atividade de glicosiltransferase que a linhagem parental.

Posteriormente Cheetham et al. (1985), obtiveram linhagens mutantes com maior produção de glicosiltransferase, mas a produção tendia a diminuir e os experimentos não foram continuados.

Smith et al. (1994), obtiveram vários mutantes após incidência de radiação ultravioleta e do tratamento com etil metano sulfonado na cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, produtora de glicosiltransferase capaz de transformar enzimaticamente sacarose em dextrana e alternana. Os mutantes obtidos apresentaram-se morfológicamente diferentes da cepa parental, sendo que as cepas obtidas após radiação ultravioleta apresentaram maior atividade de glicosiltransferase do que a cepa original e as cepas obtidas após tratamento com etil metano sulfonado menor atividade.

2.4. IMOBILIZAÇÃO CELULAR.

A imobilização de células pode ser definida, no contexto de fermentações, para descrever o confinamento ou localização de células microbianas viáveis a uma região definida do espaço, de forma a exibir características hidrodinâmicas que diferem daquelas do ambiente circundante (Dervakos & Webb, 1991).

O emprego de microrganismos como biocatalisadores para a obtenção de determinadas substâncias tem sido bastante utilizado, uma vez que estes seres têm grande poder de multiplicação e de adaptação às variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com o suprimento ou a carência de nutrientes no meio, o que permite uma ampla flexibilidade em sua utilização.

A imobilização de células microbianas viáveis para fins de fermentação vem sendo aplicada, mesmo que não intencionalmente, dentro da indústria de fermentações desde a introdução do processo de produção de vinagre por Scheutzenbach em 1823. O reconhecimento dos benefícios desse processo particular e daqueles de filtros biológicos de alta taxa, usados no tratamento de esgoto, levaram, durante os meados da década de 1970, à imobilização intencional de uma ampla faixa de outras espécies microbianas, para uma variedade de aplicações para fermentação (Dervakos & Webb, 1991). O primeiro sucesso de aplicação industrial de células microbianas imobilizadas foi a produção do aminoácido L-aspartico por Chibata e colaboradores em 1973 (citados por Coughlan & Kierstan, 1988). Portanto, a imobilização de células possui uma grande aplicação industrial, sendo especialmente apropriado na conversão de açúcares, devido ao seu pequeno tamanho e estrutura sem carga, que minimiza as restrições de difusão, devido aos efeitos característicos do uso de biocatalisadores imobilizados. A sacarose, por exemplo, possui um coeficiente de difusão de $4,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{s}$ a 25°C (Cheetham et al., 1985).

2.4.1. Vantagens da imobilização de células.

A maior vantagem da imobilização de células em comparação ao uso de enzimas imobilizadas e células livres consiste na redução do custo do processo, devido a eliminação das etapas de extração e purificação das enzimas, ao uso contínuo do biocatalisador, a

manutenção da alta densidade celular, e um sistema com menor custo de separação de células (Akin, 1987). Em relação ao metabolismo celular, apresenta uma grande vantagem, pois as reações multienzimáticas, as quais requerem atividades do metabolismo celular, como a regeneração de cofatores reduzidos e ATP, podem ser realizadas (Cheetham et al., 1979).

Dervakos & Webb (1991) descreveram várias vantagens da imobilização celular em relação as células livres. Segundo os autores, o aumento da estabilidade biológica observada nas células imobilizadas parece depender do tipo e estado fisiológico das mesmas. Quando as células não são viáveis, o aumento da estabilidade catalítica pode ser melhor atribuído ao efeito protetor da matriz de imobilização contra os obstáculos físico-químicos, tais como temperatura, pH e solventes orgânicos. Com células viáveis, porém sem crescimento ou em baixas taxas de crescimento, mecanismos adicionais tornam-se importantes, tais como a biossíntese aumentada de enzimas intracelulares compensando inativação/desnaturação enzimática, a capacidade das células de crescer em compostos excretados por células lisadas e a possibilidade de redução das taxas de degradação de massa celular.

Não apenas a estabilidade operacional, mas também a estabilidade de células vivas pode ser aumentada por imobilização. Mugnier & Jung (1985) verificaram que o número de células vivas permaneceu constante por períodos de estocagem de mais de 3 anos a 28°C quando os inóculos foram mantidos a uma atividade de água menor que 0,069. A sobrevivência das células foi relacionada a algumas propriedades da água resultante de suas interações com o biopolímero.

Vários estudos têm demonstrado que a concentração de biomassa em fermentadores de células imobilizadas é substancialmente maior do que em fermentadores convencionais de células livres. As concentrações relativamente altas de biomassa dentro das partículas de células imobilizadas podem levar a um aumento das taxas de reação e, assim, redução nos volumes dos reatores (Luong & Tseng, 1984). Entretanto, existem muitos fatores que afetam a retenção da biomassa dentro de um reator de células imobilizadas, como: a fração de volume ocupada pelo material transportador que pode efetivamente diluir a concentração celular na partícula; a depleção de nutrientes e/ou inibição pelo produto, que pode resultar

em uma distribuição heterogênea da biomassa, com uma região densamente populosa perto da superfície da partícula e com o interior vazio ou menos populoso; a carga da partícula, que afeta a sua adesão ao suporte de imobilização; o tamanho dos poros da partícula, pois determina a fugacidade das moléculas e, portanto, a retenção da biomassa; as interações biológicas entre alguns suportes e certos tipos de células; as condições físico-químicas da solução ambiente (força iônica, temperatura e pH) e várias características biológicas das células imobilizadas (dimensões, forma, método de reprodução, composição da parede celular, requerimento de oxigênio) são cruciais para se obter altas concentrações de biomassa (Dervakos & Webb, 1991).

A imobilização de células, por exercer um papel importante na redução da viscosidade dos caldos, minimiza os requerimentos de potência para agitação e aeração, e promove um aumento das transferências de gás-líquido (Gbewonyo & Wang, 1983). A imobilização pode também aumentar a densidade aparente das células e, assim, os coeficientes de transferência de massa.

A composição química do transportador pode exercer um papel importante no sentido de estabelecer um microambiente favorável para as células imobilizadas devido aos efeitos de partição. O uso de uma matriz apropriada pode aumentar a concentração do substrato nas proximidades das células imobilizadas. Fukui & Tanaka (1982) demonstraram a efetividade de géis hidrofóbicos em bioconversões envolvendo substratos orgânicos pouco hidrossolúveis, como esteróides. Similarmente, o uso de uma matriz apropriada pode reduzir a concentração do produto nas proximidades das células imobilizadas. Nakajima et al. (1986) demonstraram a efetividade de usar um gel hidrofílico na produção de pigmentos: o coeficiente de partição dos pigmentos pouco hidrossolúveis entre gel/meio diminuiu com o aumento da hidroflicidade do gel, o que resultou em aumento da liberação dos pigmentos a partir dos géis. A atividade enzimática em células imobilizadas pode ser aumentada, utilizando-se suportes ou matrizes hidrofílicas (Kumakura citado por Coughlan & Kierstan, 1988).

Dentre as várias vantagens da imobilização celular, tem sido demonstrada a sua influência no aumento da produção de vários metabólitos celulares. Os rendimentos aumentados do produto podem ser atribuídos a muitos fatores, tais como o uso extenso de

atividades biocatalíticas das células no estado imobilizado, alterações metabólicas vantajosas ou a condução do fluxo de material para o interior da célula por meio de uma via particular (Dervakos & Webb, 1991). Além da melhoria dos rendimentos de produto, com a imobilização celular ocorre também uma melhoria na estabilidade do mesmo.

Segundo Fukushima & Yamade (citados por Dervakos & Webb, 1991), a proximidade de células dentro de um agregado de células imobilizadas é importante para algumas células eucarióticas que têm a capacidade de se comunicar, além de ser vantajosa quando espécies diferentes são co-imobilizadas, permitindo a realização em um único reator de reações que são normalmente realizadas em uma série de reatores, com significativas vantagens de custo e produtividade. A coexistência de células dentro de uma matriz pode também aumentar o rendimento de certos produtos metabólicos. Isto foi demonstrado por Egorov et al. (citados por Dervakos & Webb, 1991), que, ao utilizar um sistema contendo espécies de *Nocardia* e *Arthrobacter* co-imobilizadas, obtiveram uma atividade de proteinase fibrinolítica muito maior do que com um sistema contendo apenas *Nocardia* imobilizada. Descobriu-se que o *Arthrobacter* sintetiza um polissacarídeo que estimula a síntese de proteinase por *Nocardia*.

A técnica de imobilização permite uma maior seletividade das reações, devido aos diferentes níveis de permeabilidade às diversas substâncias presentes em um meio complexo (Watanabe et al., 1988). E possui também uma versatilidade em seleção de reatores.

2.4.2. Alterações metabólicas em células imobilizadas.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o comportamento metabólico alterado das células no estado imobilizado, tais como: distúrbios no padrão de crescimento devido ao contato com o transportador da imobilização ou com outras células (Doran & Bailey, 1986); efeito na tensão superficial e na pressão osmótica (Vijayalakshmi, citado por Dervakos & Webb, 1991); atividade de água reduzida e/ou deficiência de oxigênio (Mattiasson & Hahn-Haegerdal, 1982); comunicação célula-célula (Haldimann & Brodelius, citado por Dervakos & Webb, 1991); mudanças na morfologia celular (Mahmoud & Rehm, 1986); permeabilidade alterada das membranas, causada por

interações entre a célula e o transportador da imobilização, permitindo assim a passagem de substratos de reações enzimáticas, que não podem penetrar na célula normal e/ou aumento da excreção de produtos (Beaumont & Knorr citado por Dervakos & Webb, 1991); suplementação do meio, através de compostos presentes na matriz de imobilização (Vieira et al., 1989) e limitações difusionais, que levam as células imobilizadas localizadas em certas regiões do agregado a ficarem expostas a concentrações de substratos e produtos que promovam uma via particular para o fluxo de massa dentro da célula e, assim, a produção de metabólitos associados a essa via (Kopp & Rehm, 1983).

2.4.3. Problemas introduzidos pelo processo de imobilização celular.

A imobilização de células pode levar a problemas operacionais, biológicos ou difusionais, que podem ser superados através de uma seleção criteriosa das condições de operação do reator, e com o uso de partículas de células imobilizadas com propriedades físico-químicas melhoradas.

Embora a estabilidade catalítica das células imobilizadas seja geralmente melhor quando comparada a das células livremente suspensas, o fator limitante na estabilidade operacional desses sistemas é a estabilidade do transportador, que pode ser afetada por diferentes mecanismos como: formação de fases intrapartículas, que ocorre quando a concentração de um produto gasoso dentro de uma matriz de imobilização excede seu valor de saturação, promovendo a formação de gás intrapartículas, que pode levar a, por exemplo, flutuação e/ou ruptura dos glóbulos (Qureshi et al., 1987); supercrescimento celular, que além de diminuir o rendimento do produto, pode ocasionar vários problemas operacionais como obstrução das matrizes (Buelow et al. citado por Dervakos & Webb, 1991); resistência mecânica da matriz, pois as propriedades mecânicas do transportador são muito importantes para determinar o tempo de vida operacional de um fermentador de células imobilizadas. Transportadores mecanicamente estáveis podem resistir à pressão exercida pelas células em crescimento, por formação de gás intrapartículas, e são também capazes de resistir a condições hidrodinâmicas severas, como a compactação em leitos empacotados. A presença de certos nutrientes no meio pode também alterar a estabilidade mecânica do transportador. Por exemplo, glóbulos de alginato são rompidos ou dissolvidos na presença de agentes quelantes de cátions, como fosfato (Dainty et al., 1986). Em relação

aos problemas difusionais, Scott et al. (1988) verificaram que a redução do coeficiente de difusão de diferentes substâncias para o interior da cápsula do gel é mais acentuado quanto maior for a concentração do polímero, limitando a difusão de substrato e produto.

Portanto, para se obter uma alta produtividade combinada com uma grande estabilidade operacional, é necessário a otimização do método de imobilização, modo de operação (contínuo ou batelada), aeração e homogeneização, configuração do reator, composição do meio (substratos, precursores ou nutrientes adicionais), temperatura, pH e remoção do excesso de biomassa e/ou “requerimento do produto *in situ*”. O estudo da influência de cada parâmetro sobre a estabilidade operacional contribui para: criação de um envoltório celular que permita um apropriado fluxo de oxigênio, substratos, precursores ou nutrientes, induzindo condições ambientais que levam as células a uma alta produtividade; estabilização e extensão da atividade inicial específica com ótima regeneração após a diminuição; controle estável do fluxo do processo e uma viabilidade para operações em grande escala (Freeman & Lilly, 1998).

2.4.4. Métodos de imobilização e tipos de suporte.

Akin (1987), classificou os suportes ou matrizes para a imobilização em sete grupos: suportes ou matrizes sólidas para adesão ou adsorção de células; suportes ou matrizes sólidas para ligação cruzada com as células; ligação cruzada entre as células; gel e outros polímeros para o encapsulamento das células; combinação de géis e outros polímeros para o encapsulamento de células; combinações de várias matrizes de imobilização (gel, polímeros, agentes de ligação cruzada e partículas sólidas) e estruturas côncavas e placas (membrana do reator) para retenção física das células.

De acordo com os estudos de Akin (1987) e Coughlan & Kierstan (1988), o encapsulamento de células com alginato de cálcio é o método de imobilização de células mais popular. A popularidade do alginato para a imobilização de células por encapsulamento é atribuído aos seguintes fatores: não é tóxico, produção rápida da imobilização, facilmente esterilizado e as células permanecem vivas por um longo tempo. A imobilização é efetuada em condições muito brandas, com pequena perda da viabilidade da maioria das células. Ligações químicas não são necessárias e as células não são expostas

a nenhum reagente nocivo. A imobilização pode ser feita em tampão isotônico, em pH neutro e a uma faixa de temperatura de 0–100°C. O tempo de reação, incluindo a lavagem das esferas na solução de cloreto de cálcio, situa-se entre poucos minutos até 30 minutos. O gel de encapsulamento é facilmente preparado em condições estéreis, por autoclavagem ou por filtração da solução de alginato de sódio antes da homogeneização com as células. Uma vez imobilizadas, as células são protegidas de contaminação.

O alginato é um copolímero linear de dois ácidos urônicos, β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, ligados entre si por ligações glicosídicas β 1:4 e α 1:4 na seqüência. Os dois monômeros são distribuídos em blocos homopoliméricos, intercalados com seqüências contendo ambos os monômeros. A alta viscosidade do gel depende principalmente do peso molecular do alginato e da afinidade para íons, e a propriedade para formação de géis está relacionada com o conteúdo de ácido gulurônico. Quando dois resíduos de ácido gulurônico estão em posições vizinhas na cadeia do polímero, eles formam um sítio de ligação para os íons cálcio. Conseqüentemente, o conteúdo de blocos de ácido gulurônico é determinante para a força e estabilidade do gel. O alginato é extraído de algas marrons, podendo ser produzido por bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* (Ertesvag & Valla , 1998).

Os géis de alginato de cálcio tem se mostrado compatíveis com a maioria das células vivas e, em muitos casos, a viabilidade e/ou atividade enzimática permanece estável por extensos períodos. As esferas de alginato são facilmente produzidas em grande escala sem equipamentos sofisticados. Usualmente as células são homogeneizadas com uma solução de alginato e posteriormente gotejadas em uma solução contendo cátions multivalentes tais como cálcio, bário, estrôncio ou alumínio. Por gelatinização ionotrópica, as esferas são instantaneamente formadas, encapsulando as células dentro da estrutura tridimensional do gel. O gel de alginato de cálcio é termoestável na faixa de temperatura de 0-100°C. O alginato não é tóxico, sendo aceito como aditivo em alimentos, tendo grandes aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica, pois também não promove danos técnicos, tóxicos ou corrosivos aos materiais usados. As esferas são facilmente dissolvidas em condições brandas e as células regeneradas. As poucas limitações da imobilização de células com alginato consistem no uso de substâncias que possuam grande afinidade com o cálcio, pois provocaria uma desestabilização do gel. Portanto, tampões contendo citrato ou

fosfato são de uso limitado. Desestabilização também pode ocorrer nas colunas de cálcio se houver uma alta concentração de sódio, potássio e magnésio, sendo recomendado a adição de 3mM de cálcio no meio circundante (Akin, 1987).

Tate & Lyle (1981), verificaram que as células de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578, imobilizadas em gel de alginato de cálcio, apresentaram maior estabilidade (8500 horas) quando comparadas com outras técnicas de imobilização tais como: DEAE celulose, poliacrilamida, agregados de células em glutaraldeído, ágar, goma xantana de alfarroba e goma K-carragena de alfarroba.

Cheetham et al. (1985), investigaram a produção de isomaltulose através de células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas. As células foram imobilizadas em diferentes matrizes (ágar, acetato de celulose, colágeno, goma xantana de alfarroba e alginato de cálcio) e testadas em um biorreator de leito empacotado. O melhor resultado foi obtido com células imobilizadas em alginato de cálcio. As células imobilizadas produziram 1500 vezes o seu peso de isomaltulose durante 1 ano de uso, e sua estabilidade foi maior quando utilizou-se 55% de sacarose como substrato.

De acordo com Xyrofin Oy (2000a), pode-se otimizar a imobilização celular pela adição de agentes de reticulação, tais como glutaraldeído, e agentes floculantes, tais como ácido tânico e polietilenoimina. Verificou-se que a floculação aumenta a conversão e prolonga a meia vida do sistema imobilizado. Os autores imobilizaram microrganismos em um material de troca de ânions fracamente básico sob a forma de dietilaminoetil-celulose modificada (DEAE-celulose) que inclui microfibras ou micropartículas aglomeradas com poliestireno. Acredita-se que as forças elétricas estabelecidas entre a resina positivamente carregada e as células microbianas negativamente carregadas sejam primariamente responsáveis pela ligação das células microbianas às superfícies da resina. Esta ligação reduz substancialmente a lixiviação dos microrganismos e permite um contato íntimo entre os microrganismos e a solução de sacarose.

Segundo Xyrofin Oy (2000a), o material imobilizante deve ter uma matriz porosa sólida capaz de resistir à deformação e permitir o fluxo do substrato pela coluna, sem causar grande queda da pressão.

2.4.5. Fatores a serem considerados no processo de imobilização em alginato de cálcio.

2.4.5.1. Concentração do alginato de sódio.

Ogbonna et al. (1989), estudaram a influência da concentração de alginato (0,5 a 4%) na resistência mecânica das esferas, em função do número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Verificou-se que as esferas obtidas com 2% de alginato apresentaram menos rompimentos, não ocorrendo diferenças significativas entre 1 e 2 % de alginato. As esferas preparadas com alginato 0,5%, apresentaram mais rompimentos. Segundo os autores, concentrações altas de alginato causam problemas de viscosidade e resultam em esferas com difusão deficiente, sendo que em alginato 4% a homogeneização do mesmo com a suspensão celular foi difícil, resultando em esferas com diferentes concentrações celulares.

Segundo Cheetham et al. (1979), a concentração mínima de alginato necessário para a formação de esferas perfeitas é 1%, sendo que esferas confeccionadas com concentração menor do que 1% apresentaram menor força mecânica e não houve a formação de géis de alginato, quando utilizou-se 0,01% de alginato. O tempo de permanência do substrato nas esferas é dependente do coeficiente de partição e de difusão do mesmo, sendo que concentrações menores de alginato e cloreto de cálcio facilitam a transferência de substrato para o interior das esferas. Os pesquisadores também verificaram que a porosidade das esferas diminui quando usa-se muito gel polimerizado, devido ao emprego de altas concentrações de alginato e cloreto de cálcio.

Estudando o efeito da concentração de alginato (1 a 4%) na taxa de liberação da hemoglobina e de NAD das esferas de alginato, Kierstan et al. (1982) verificaram que as características de difusão de compostos de baixo peso molecular, como o NAD, não são afetadas pelo aumento da concentração de alginato. Nos compostos de alto peso molecular, como a hemoglobina, ocorre uma grande influência, sendo que haverá uma liberação mais rápida da hemoglobina em concentrações baixas de alginato.

Mohamed et al. (2000), estudaram a produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase a partir de células de *Bacillus amyloliquefaciens* imobilizadas em alginato de cálcio tendo, verificado que as esferas produzidas com alginato 2% apresentaram menor estabilidade e com alginato 5% problemas de difusão sendo que a maior atividade foi obtida com alginato 3%

As publicações indicam níveis variados de concentração de alginato de cálcio utilizado no processo de imobilização, situando-se na faixa de 1% (Onaka et al., 1985) até 16% (Largier et al., 1985).

2.4.5.2. Concentração de cloreto de cálcio .

Ogbonna et al. (1989) estudaram a influência da concentração de cloreto de cálcio (0,05M a 0,3 M) na resistência mecânica das esferas, em função do número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Verificou-se que a solução de cloreto de cálcio 0,2M apresentou menor porcentagem de esferas rompidas em relação às outras concentrações testadas, mas a relação não foi linear. De acordo com os autores, a concentração de cloreto de cálcio tem pouca influência nas características de difusão das esferas. Além disso a quantidade de cálcio necessária para a gelatinização das esferas é muito pequena. Em 2 horas de incubação a quantidade de cálcio usado por mL de esferas foi de 8,90 mg, aumentando para 10,10 mg em 24 horas de incubação. Os autores também investigaram se o rompimento das esferas poderia estar associado a liberação de cálcio. Verificou-se que 70% do cálcio liberado ocorria nas primeiras 24 horas de incubação, sendo que após 72 horas nenhuma liberação de cálcio foi detectada. Como a maioria das esferas apresentaram rompimento durante 50 horas de incubação, não é correto atribuir o rompimento à liberação de cálcio. Isto porque a liberação de cálcio ocorre imediatamente após a incubação, enquanto que o rompimento das esferas ocorreu somente após um bom crescimento das células no interior das esferas. Portanto, isto demonstra que a formação de gás carbônico pode contribuir muito mais para o rompimento das esferas do que a liberação de cálcio.

De acordo com Cheetham et al. (1979), a concentração mínima de cloreto de cálcio para a formação de esferas perfeitas é de 0,1M, sendo que esferas confeccionadas com concentrações de cálcio menor do que 0,08 M apresentaram menor força mecânica.

Dominguez et al. (1999), visando a melhoria da estabilidade das esferas, durante a produção de xilitol por imobilização de células, promoveram a lavagem das mesmas com uma solução de alumínio 0,3M. Este procedimento resultou num aumento da retenção celular e da força mecânica, mas diminuiu a produção de xilitol pelo processo. Provavelmente, o alumínio 0,3M inibiu a xilose redutase. O alumínio pode ser tóxico, dependendo da concentração utilizada e do tipo do microrganismo.

Estudando o efeito da concentração de cloreto de cálcio na taxa de liberação da hemoglobina das esferas de alginato, Kierstan et al. (1982) verificaram que, em esferas confeccionadas com alginato 1% e com um diâmetro de 2mm, não houve alteração das características de difusão da hemoglobina, quando variou-se a concentração de cloreto de cálcio de 0,125 M para 0,5 M, apresentando o mesmo resultado quando utilizou-se moléculas de NAD.

2.4.5.3. Tempo de geleificação.

Ogbonna et al. (1989) estudaram a influência do tempo de incubação em cloreto de cálcio na estabilidade do gel das esferas. Constatou-se que a estabilidade do gel em tampão citrato foi maior nas esferas que tiveram um tempo de geleificação mais duradouro, não ocorrendo diferenças significativas a partir de 22 horas de incubação. Portanto, um tempo maior de geleificação resulta num aumento da estabilidade das esferas. Segundo os autores, a estocagem das esferas em solução de cloreto de cálcio 0,2 M a 4°C por 5 semanas não resultou em redução significativa da viabilidade celular.

2.4.5.4. Diâmetro das esferas.

Segundo Freeman & Lilly (1998), o crescimento celular depende da limitação difusional imposta pela porosidade da matriz do gel e posteriormente pelo impacto da biomassa acumulada. No caso do gel de alginato e carragena o crescimento celular é maior na camada externa, devido a restrição de oxigênio e nutrientes internamente. A penetração

efetiva do oxigênio no alginato tem sido estimada entre 0,1-0,15 mm, levando à conclusão de que o tamanho ótimo das esferas é na faixa de 0,1-0,3 mm. Um crescimento desigual leva à formação de uma população não homogênea dentro das esferas, pois as células próximas à superfície podem adotar um estágio fisiológico diferente das células sem alimento do interior das esferas, provocando uma migração das células internas para a superfície, aumentando a pressão por acúmulo de célula, afetando a estrutura e propriedade mecânica do gel, levando a liberação de células. O uso prolongado de células imobilizadas viáveis envolve um contínuo crescimento de células, bem como lise e morte das mesmas. A matriz que envolve a célula deve ser permeável à troca com o meio que a circunda, de células inteiras ou destruídas sem perda da sua estabilidade mecânica.

Utiliza-se geralmente a formação esférica nos processos de imobilização, de modo a oferecer menos resistência ao fluxo do substrato através da coluna. De acordo com Cheetham et al. (1979), o diâmetro das esferas entre 2,85 e 4,5 mm não influencia a taxa de fluxo do substrato pela coluna.

Estudando o efeito do diâmetro das esferas na taxa de liberação da hemoglobina e de NAD das esferas de alginato, Kierstan et al. (1982) verificaram que as características de difusão de ambos são afetadas pelo diâmetro das esferas, sendo que no caso do NAD esta influência é pequena, apresentando um efeito maior na hemoglobina. Géis de 5 mm de diâmetro apresentaram pouco ou nenhum problema de difusão dos compostos de baixo peso molecular, mas a liberação e difusão de moléculas de alto peso molecular foi grandemente restrita em esferas com diâmetros entre 2 e 5 mm.

As diversas publicações indicam diâmetros variados das esferas, situando-se entre 0,8 mm (Habets-Crutzen et al., 1984) e 5 mm (Nakajima et al., 1985).

2.4.5.5. Concentração inicial de células.

Ogbonna et al. (1989) verificaram que, em altas concentrações iniciais de células, ocorreu uma alta porcentagem de esferas rompidas, sendo provavelmente devido ao grande número de células encontradas no centro das esferas, resultando numa taxa de formação de gás carbônico maior do que a taxa de difusão do gás através das esferas, levando a um

aumento da pressão do gás no centro das esferas, com conseqüente rompimento das mesmas. Contudo, em baixas concentrações iniciais de células, a população final é muito baixa após o período de incubação.

Tate & Lyle (1981) estudaram a produção de isomaltulose, utilizando *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 imobilizada em gel de alginato, e verificaram que a concentração de células deve situar-se entre 10 e 40%, mais especificamente 20% (p/v).

A partir de células de *Protaminobacter rubrum* imobilizadas em alginato de cálcio, Hashimoto et al. (1987), obtiveram isomaltulose utilizando-se 6-cloro-6-dioxisacarose como substrato. A atividade máxima das células imobilizadas ocorreu em 3 horas, a pH 5,5 e foi proporcional à quantidade de células sendo obtidos conversão de 18%, 30% e 44% para 10, 20 e 40 mg de células/mL de solução respectivamente.

Chang et al. (1996) utilizaram Tween 20 (0,1%) durante a microencapsulação de células recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato, visando prevenir a ruptura das esferas devido a produção de gás carbônico pelo processo de fermentação alcóolica.

Kuek & Armitage (1985), por microscopia eletrônica, verificaram que o crescimento dos micélios de *Aspergillus phoenicus* em esferas de alginato de cálcio foi restrito à superfície, e que o grau de agitação foi um fator de estabilidade da superfície das esferas.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE.

As linhagens de *Klebsiella* sp K18 (Uekane, 1993), *Klebsiella* sp S-390, *Erwinia* sp D12 (Celestino, 1996) e 265-9 que possuem atividade de glicosiltransferase, foram utilizadas para os estudos da produção de glicosiltransferase. Estas linhagens foram isoladas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP.

3.1.1. Estudo da produção de glicosiltransferase pelas linhagens *Klebsiella* sp K18, *Klebsiella* sp S-390, *Erwinia* sp D12 e 265-9.

A produção de glicosiltransferase pelas linhagens de microrganismos foi testada em frascos Erlenmeyer de 50mL contendo 10mL de meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 4% de peptona e 0,4% de extrato de carne (Uekane, 1993), incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C. Para a preparação do pré-inóculo as culturas jovens das 4 linhagens foram inoculadas com alça de platina em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura descrito acima. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C por 15 horas e, posteriormente, 1 mL de amostra do pré-inóculo foi retirado e inoculado em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL do meio acima citado. Após 6, 15, 24, 36 e 48 horas de fermentação as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. O pH foi analisado no sobrenadante, utilizando-se pHmetro e, após lavagem da massa celular com água destilada, retirou-se uma amostra para determinação da massa celular através da leitura da absorbância, como descrito no item 3.4.3.3. A atividade da glicosiltransferase foi determinada na massa celular como descrito a seguir.

3.1.1.1. Determinação da atividade da glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada.

As amostras de massa celular obtidas de acordo com o item anterior, foram lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida, cada amostra de massa celular foi ressuspendida

em 20 mL com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0, e a suspensão celular, resfriada a 5°C, e submetida a tratamento em ultrasonicador por 20 segundos a 180-200W. Após a lise da parede celular, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm durante 15 minutos a 5°C, e a atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante através do aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose, como descrito por Nagai-Miyata et al. (1993) e Uekane (1993), com modificações. A mistura de 450µL da solução de sacarose 4% em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH6,0 e 50µL de solução enzimática foi incubada a 35°C por 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro, utilizou-se um “branco” substituindo 50µL de amostra por 50µL de água destilada na mistura de reação. Este teste foi realizado em triplicata. Uma unidade de glicosiltransferase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de isomaltulose/minuto/mL da enzima a partir de sacarose sob as mesmas condições do ensaio. A Figura 1 ilustra o processo de sonicação utilizado para o rompimento celular.



FIGURA 1 – Processo de sonicação da parede celular.

3.2. OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES A PARTIR DA LINHAGEM *Erwinia* sp D 12.

3.2.1. Mutação com ultravioleta.

A indução de mutação foi realizada como descrito por Smith et al. (1994), com modificações.

O microrganismo *Erwinia* sp D12 produtor de glicosiltransferase, capaz de converter sacarose em isomaltulose foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura composto de 1 % de peptona , 0,4 % de extrato de carne e 1 % de sacarose, ajustado para pH 6,5. Após 5 , 10 , 15 e 24 horas de incubação a 30°C e 200 rpm, as células foram coletadas assepticamente por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e lavadas duas vezes com 20 mL de água estéril. A massa celular foi ressuspendida em 10mL de água estéril, e a concentração de massa celular foi ajustada para obtenção de valores de absorbância (660 nm) entre 0,4 e 0,5. Aliquotas de 20µL da suspensão celular padronizada foram transferidas para placas de petri de 150mm de diâmetro contendo meio de cultura estéril, composto de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne, 4% de sacarose e 1,5% de ágar. Posteriormente, as placas foram irradiadas por 30 segundos, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 minutos e uma hora com lâmpada UV (300 nm, 15W) a uma distância de 17 cm.

A irradiação também foi efetuada em células contidas em placas de petri sem meio de cultura. Uma alíquota de 2 mL da suspensão celular padronizada foi transferida para uma placa de petri de 150mm de diâmetro vazia e após 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos de radiação ultravioleta, retirou-se 20µL da amostra e semeou-se em placas de petri contendo o meio de cultura acima citado.

A irradiação e passos subsequentes foram realizados no escuro para prevenir foto-reativação. As placas obtidas foram incubadas a 30°C por 48 horas e as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ágar inclinado com o meio descrito acima. A produção de glicosiltransferase foi testada como descrito no item 3.1.1.1.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CIRCULANTE

3.2.2. Mutação com Metil-N-Nitroso-Guanidina.

A indução da mutação foi realizada como descrito por Cheetham et al. (1984). O reagente metil-N-nitroso-guanidina (100µg/mL) foi dissolvido em 25 mL de tampão citrato 0,10 M pH 6,0, e incubado em banho-maria a 37°C por 20 minutos. A esta solução foi adicionado 1g de massa celular fresca dos microrganismos produtores de glicosiltransferase. As células foram incubadas por 30 minutos a 37°C em banho-maria e, posteriormente, centrifugadas e ressuspensas em uma solução de sacarose 4%, onde permaneceram por 12 horas a 4°C. Amostras de 25, 50 e 100µL foram semeadas em placas de ágar contendo sacarose 4%, extrato de carne 0,4 % e peptona 1% em pH 7,0. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ágar inclinado, e a produção de glicosiltransferase foi testada como descrito no item 3.1.1.1. As vidrarias foram descontaminadas com a seguinte solução: NaH₂PO₄.2H₂O 15 g/L, Na₂HPO₄ 14,2 g/L e Na₂S₂O₃ 31 g/L.

3.3. SELEÇÃO DO MICRORGANISMO MUTANTE PRODUTOR DE GLICOSILTRANSFERASE.

O microrganismo submetido ao processo de mutação foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura composto de 1 % de peptona, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose, ajustado para pH 6,5 (Lund & Wyatt, 1973). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200rpm durante 24 horas a 30°C. Após esse período, os meios de cultura foram centrifugados a 11.000 x g durante 15 minutos. A massa celular foi lavada 3 vezes com água destilada, por centrifugação e ressuspensa em 10 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 6,0. A suspensão celular foi resfriada a 5°C e submetida a oscilações ultrassônicas a uma frequência de 200 W por 20 segundos em banho de gelo. A atividade da glicosiltransferase no sobrenadante foi determinada pelo aumento do poder redutor da solução contendo sacarose através do método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se como padrão a glicose como descrito no item 3.1.1.1.

3.4. OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO MICRORGANISMO SELECIONADO.

3.4.1. Efeito da concentração de sacarose ou melaço no meio de cultura sobre a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Para verificar a influência da concentração de sacarose ou melaço no meio de cultura sobre a produção de glicosiltransferase, foram utilizados meios de cultura constituídos de peptona 1%, extrato de carne 0,4% e concentrações de sacarose (0-10%) ou melaço (0-10% de sólidos solúveis totais) e, posteriormente, concentrações de melaço variando de 0 a 20% (sólidos solúveis totais). Os frascos Erlenmeyer de 50mL contendo 10mL de meio de cultura foram inoculados com 1mL de cultura de 15 horas. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200rpm a 30°C por 6, 15 e 24 horas. A atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante obtido após rompimento das células por sonicação, como descrito no item 3.1.1.1.

3.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Para verificar a influência da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase, foram utilizados meios de cultura constituídos de melaço (12% de sólidos solúveis totais), extrato de carne 0,4% e concentrações de peptona variáveis entre 0 a 10%. Os frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 30mL de meio de cultura foram inoculados com 3mL de cultura de 15 horas do microrganismo D12. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C por 15 horas. Após o período de incubação, a atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante obtido após rompimento das células por sonicação, de acordo com o item 3.1.1.1.

3.4.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C, 30°C e a 32°C.

A linhagem *Erwinia* sp D12 que apresentou melhor atividade de glicosiltransferase, capaz de converter sacarose em isomaltulose, foi utilizada para os estudos de produção de glicosiltransferase em mini-fermentador New Brunswick de 3 L.

3.4.3.1. Preparação do inóculo.

Para a preparação do inóculo, 100mL de meio de cultura constituído de peptona 4%, extrato de carne 0,4% e de melaço (12% de sólidos solúveis totais), ajustado para pH 6,5 (Lund & Wyatt, 1973), contido em 2 frascos de Erlenmeyer de 250mL, foram inoculados com a linhagem do microrganismo e incubado a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por um período de 15 horas.

3.4.3.2. Fermentação.

A fermentação foi realizada em mini-fermentador New Brunswick de 3 litros, sendo ilustrada pela Figura 2. Adicionou-se assepticamente 200mL do inóculo preparado de acordo com o item anterior ao frasco de cultura contendo 1.800mL de meio de cultura previamente esterilizado. A fermentação foi realizada a 28°C, 30°C e a 32°C, mantendo-se aeração de 1vvm (volume/volume/minuto) e agitação constante. As amostras do meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.4.3.3 e determinação da atividade enzimática. A atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante da massa celular sonicada, de acordo com o método descrito no item 3.1.1.1. Para a extração da glicosiltransferase intracelular, 20mL de suspensão de células em tampão citrato-fosfato, provenientes de 10mL do meio de fermentação, foram submetidos a ultrasonicação durante 20 segundos a 200 W, como descrito no item 3.1.1.1.



FIGURA 2 – Fermentação em mini-fermentador New Brunswick de 3 litros.

3.4.3.3. Determinação do crescimento do microrganismo.

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm (Malette, 1969). Após a fermentação, uma amostra de 10mL de meio de cultura foi centrifugada a 11.000 rpm a 5°C durante 15 minutos, e o precipitado obtido foi submetido a três lavagens sucessivas com 20 mL de água destilada nas mesmas condições descritas acima. A massa celular da última lavagem foi ressuspendida em 10 mL de água destilada e uma alíquota da suspensão foi diluída para se obter a leitura na faixa de linearidade do método. A leitura de absorbância da amostra foi realizada contra água destilada a 660 nm.

3.5. IMOBILIZAÇÃO DA MASSA CELULAR.

Uma suspensão de células contendo 20% (p/v) de células úmidas foi misturada completamente com uma solução 1% de alginato de sódio (Sigma), de alta viscosidade

contendo 0,1% de *Tween 80* em uma proporção de volume de 1:2. A mistura foi homogeneizada com agitador magnético e gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex), em uma solução de cloreto de cálcio 2% para formar pequenas esferas de 3mm de diâmetro, que foram mantidas imersas na solução geleificante por 24 horas em temperatura de geladeira. Antes de serem utilizadas, as esferas foram lavadas com água destilada, para a remoção do excesso de geleificante. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas. A Figura 3 ilustra o processo de imobilização da massa celular com alginato de cálcio.

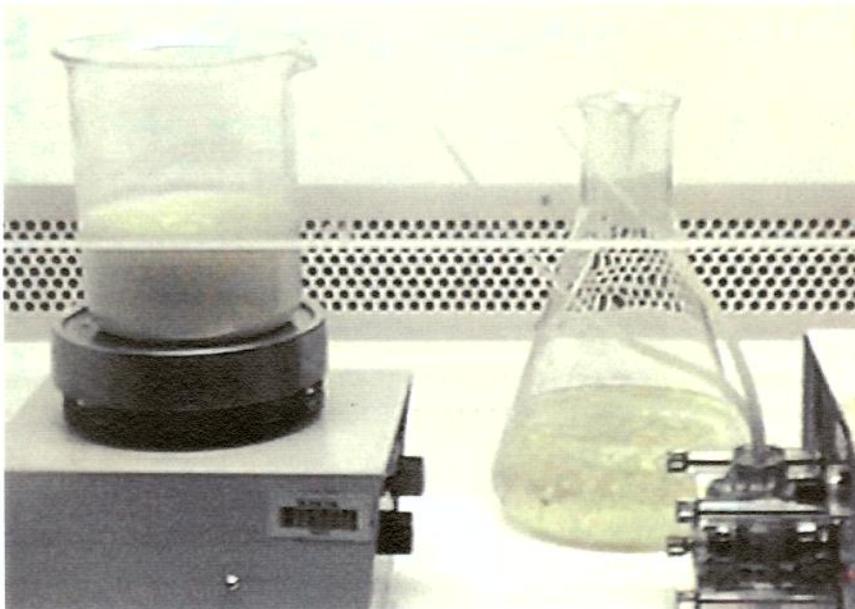


FIGURA 3 – Processo de imobilização da massa celular de *Erwinia* sp D12 com alginato de cálcio.

3.6. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE.

3.6.1. Efeito da concentração de substrato e da temperatura no rendimento da célula imobilizada.

Amostras de 40g de células imobilizadas foram transferidas para uma coluna encamisada (20 cm de comprimento x 2,5 cm de diâmetro). Nesta coluna foram injetadas soluções de sacarose com concentrações variando de 12,5 a 60 % (p/v), no sentido ascendente (contra-fluxo) numa vazão de 21,88 mL/h. A temperatura da coluna variou entre 25°C e 35°C, e a conversão de sacarose para isomaltulose foi acompanhada durante 24 horas. Posteriormente, realizou-se um novo experimento com concentrações de sacarose variando de 20 a 30 % e temperaturas de 35°C e 40°C. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da UNIFENAS-MG. A Figura 4 ilustra o processo de conversão de sacarose em isomaltulose em colunas de leito fixo contendo células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas com alginato de cálcio.

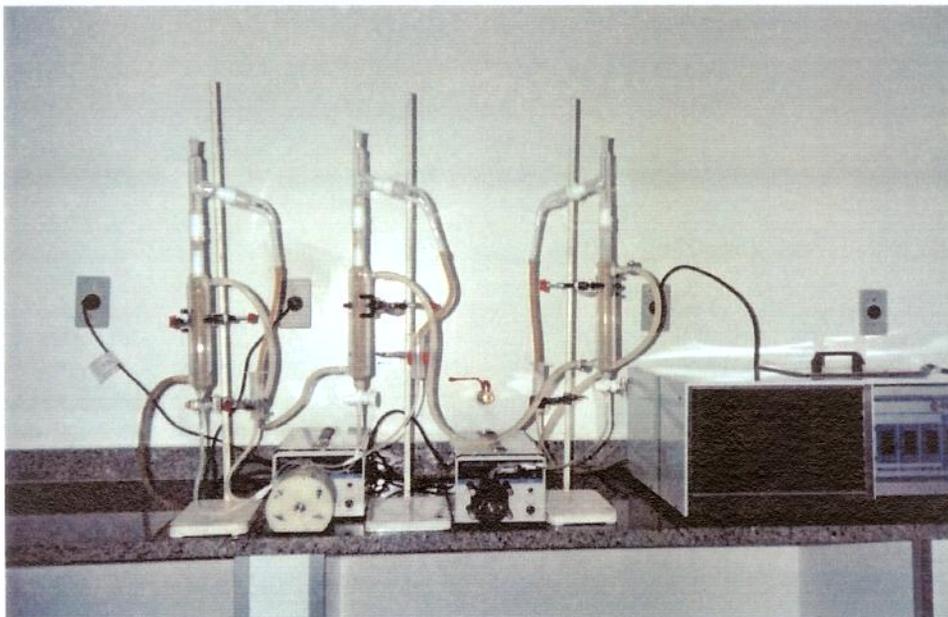


FIGURA 4 – Processo de conversão de sacarose em isomaltulose em colunas de leito fixo contendo células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas com alginato de cálcio.

3.6.1.1. Determinação da conversão de sacarose em isomaltulose.

As análises dos carboidratos foram realizadas através de cromatografia líquida de troca iônica de alta eficiência, utilizando-se um cromatógrafo líquido Dionex DX 300, contendo uma coluna carbo Pac PA1 (250 x 4 mm) e integrador Dionex 4400. A fase móvel consistia de hidróxido de sódio 150mM degaseificado com hélio e, foi utilizada a uma

vazão de 1 mL/minuto em temperatura ambiente. A detecção dos açúcares baseou-se em amperometria pulsada, sendo os carboidratos detectados por oxidação com eletrodo funcional de ouro. As amostras foram identificadas, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose. Os açúcares analisados apresentaram os seguintes tempos de retenção em minutos: glicose (3,10), frutose (3,34), sacarose (5,06) e isomaltulose (6,32). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

3.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

3.7.1. Otimização da produção de isomaltulose a partir de células imobilizadas de *Erwinia* sp D12.

Para verificar a influência da concentração de substrato e da temperatura na transformação enzimática da sacarose em isomaltulose, pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, utilizou-se um planejamento baseado na Metodologia de Superfície de Resposta. No planejamento fatorial foram selecionados dois níveis (-1 e +1) para cada variável de entrada (n), sendo necessário a realização de 2^n ensaios diferentes. As variáveis independentes estudadas foram as seguintes:

Concentração de sacarose (12,5 – 60 %);

Temperatura (25 – 35 °C).

Foram acrescentados mais três ensaios em triplicata nas condições intermediárias aos níveis mínimo e máximo, no ponto central, ou seja as coordenadas foram (0,0...,0), para cálculo do erro experimental.

O planejamento fatorial inicial foi ampliado com mais $2n$ ensaios, ou seja, 4 experimentos em “configuração estrela” para ajuste dos modelos quadráticos. Este planejamento é idêntico ao já existente, porém, girado de 45 graus em relação à orientação de partida. Geometricamente estes, novos pontos estão a uma distância de 1,41 do ponto

central (em variáveis codificadas). O cálculo do valor de α foi realizado utilizando-se a seguinte equação: $\alpha=(2^n)^{1/4}$, onde n é igual ao número de variáveis independentes.

Os níveis codificados e decodificados das variáveis independentes para o ensaio estão apresentados na Tabela 1 e os ensaios realizados na Tabela 2. Foram realizados onze ensaios, quatro do fatorial completo, quatro do planejamento estrela e três repetições no ponto central.

Os valores de concentração de sacarose e de temperatura utilizados foram selecionados de acordo com os valores obtidos na literatura (Tate & Lyle, 1981).

Todos os cálculos estatísticos usados na análise dos resultados, foram realizados com o emprego de programas computacionais (STATISTICA versão 5.0), utilizando-se o “Experimental Design”. A qualidade do ajuste de modelos polinomiais foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 , e sua significância estatística determinada pelo teste F. A superfície de resposta foi construída a partir da equação de regressão.

TABELA 1. Níveis das variáveis independentes estudadas

Variáveis Independentes	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura	25,0	26,5	30,0	33,5	35,0
Concentração de sacarose	12,5	19,4	36,25	53,1	60,0

TABELA 2. Ensaios do planejamento experimental realizado (Valores codificados e decodificados).

Ensaios	Valores codificados		Valores decodificados	
	Temperatura (°C)	Sacarose (%)	Temperatura (°C)	Sacarose (%)
1	-1	-1	26,5	19,4
2	+1	-1	33,5	19,4
3	-1	+1	26,5	53,1
4	+1	+1	33,5	53,1
5	- α	0	25,0	36,25
6	+ α	0	35,0	36,25
7	0	- α	30,0	12,5
8	0	+ α	30,0	60,0
9	0	0	30,0	36,25
10	0	0	30,0	36,25
11	0	0	30,0	36,25

3.8. PURIFICAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DA ISOMALTULOSE.

3.8.1. Processo de purificação.

Dois litros do xarope obtido da coluna com células imobilizadas descrita no item 3.6.1, foram coletados e submetidos a uma filtração em terra diatomácea. Após a filtração, o eluato foi homogeneizado a 30°C e submetido a cromatografia de troca iônica, em uma coluna de 30cm de comprimento e 4cm de largura, contendo 310 mL de resina aniônica MSA1 (Dowex), tratada com hidróxido de sódio 3% e lavada com água deionizada até pH 11. O fluxo utilizado foi de 8mL de xarope por minuto. Devido a saturação da coluna, a resina foi trocada e o procedimento citado acima repetido. Posteriormente, a amostra recolhida foi submetida a cromatografia de troca iônica, em coluna contendo 310mL de resina catiônica 88 Dowex, ativada com ácido clorídrico 7% e lavada com água deionizada

até pH 3,0. Para finalizar o processo de retirada de íons e ácidos, o xarope foi eluído em uma coluna mista contendo as duas resinas acima citadas. O processo de purificação foi realizado de acordo com o descrito por Cheetham (1987), com algumas modificações.

3.8.2. Processo de cristalização.

Após a deionização, o xarope obtido foi submetido a um processo de concentração, num rotavapor RE120 (Figura 5), sendo evaporado a cerca de 70% (p/v) a 52,7°C. Posteriormente, realizou-se um perfil de cristalização, variando-se lentamente a temperatura de 40°C a 10°C. Para a realização do perfil, o xarope foi colocado em um banho-maria, inicialmente a 40°C, e submetido a uma constante agitação (Figura 6). O banho-maria foi programado para abaixar 5°C/hora entre 40°C e 35°C e 2°C/hora entre 35°C e 25°C e, finalmente, 3°C/hora entre 25°C e 10°C, finalizando-se assim a cristalização. Os cristais foram coletados por centrifugação contínua a 3300 rpm por 10 minutos e borrifados com água gelada. A secagem foi efetuada a 80°C em estufa a vácuo por 1 hora. O processo de cristalização foi realizado de acordo com a metodologia empregada por Xyrofin Oy (2000a), com modificações.



FIGURA 5 – Concentração do xarope através de um rota evaporador.



FIGURA 6 – Processo de cristalização da isomaltulose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GLICOSILTRANSFERASE.

A seleção do microrganismo melhor produtor de glicosiltransferase foi testada de acordo com o item 3.1.1. Entre as quatro linhagens testadas, a linhagem *Erwinia* sp D12 apresentou maior atividade de glicosiltransferase (Tabela 3). A linhagem D12 apresentou maior atividade de glicosiltransferase (5,42 unidades de atividade/mL de meio de cultura) após 24 horas de fermentação (Tabela 3). Nas condições experimentais utilizadas, houve aumento da massa celular em função do tempo de fermentação (Tabela 3) e o pH não apresentou variações significativas mantendo-se entre 5,7 – 6,2 em todos os tempos de fermentação nas diferentes linhagens.

TABELA 3. Produção de glicosiltransferase pelas linhagens *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp S390, *Klebsiella* sp K18 e 265-9 – Efeito do tempo de fermentação na produção da enzima e crescimento celular.

Linhagens	<i>Erwinia</i> sp D12		<i>Klebsiella</i> sp S390		<i>Klebsiella</i> sp K18		265-9	
	Atividade (U/mL)	Massa celular (Abs) 660nm	Atividade (U/mL)	Massa celular (Abs) 660nm	Atividade (U/mL)	Massa celular (Abs) 660nm	Atividade (U/mL)	Massa celular (Abs) 660nm
6	5,03	3,21	1,93	3,57	1,77	3,32	1,26	3,02
15	4,69	3,69	2,50	3,85	1,29	3,66	2,28	3,72
24	5,42	4,46	2,65	4,34	1,47	3,85	2,58	3,94
36	3,77	4,06	2,37	4,63	1,48	4,08	2,35	4,62
48	3,99	4,74	2,40	5,04	1,37	4,24	2,43	4,67

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 3 foram compatíveis com Bando & Sato (1997), que em estudo comparativo da produção e características bioquímicas das glicosiltransferases de *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp K18 e *Klebsiella* sp S390 para conversão de sacarose em isomaltulose, verificaram que a linhagem *Erwinia* sp D12 apresenta maior atividade de glicosiltransferase do que a *Klebsiella* sp S390 e a *Klebsiella*

sp K18, quando cultivadas em um meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 4% de peptona e 0,4% de extrato de carne.

Segundo Bando & Sato (1997), as glicosiltransferases de *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp K18 e *Klebsiella* sp S 390 apresentam atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,5 e na faixa de 35°C a 40°C. As glicosiltransferases mostraram-se termosensíveis e apresentaram estabilidade na faixa de pH 5,0 a 7,0. A glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 apresentou atividade ótima em em pH 6,0 e a 40°C e mostrou-se mais termoestável do que as demais, sendo observado 66% de atividade residual após 24 horas de incubação a 35°C na ausência de substrato. A glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 mostrou estabilidade máxima em pH 6,0 em tampão fosfato e em pH 5,5 em tampão citrato-fosfato.

De acordo com Celestino (1998), a glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 possui valores de K_m e V_{max} de 138mM de sacarose e 9,81 μ mol de isomaltulose/minuto/mg de proteína, respectivamente, para o substrato sacarose.

Destacam-se na literatura as linhagens de *Protaminobacter rubrum* (Mauch & Schmidt - Berg - Lorenz ,1964), citados por McAllister et al. (1990), *Erwinia caratovora* var. atroseptica (Lund & Wyatt, 1973), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1982), *Serratia plymuthica* (Fuji et al.,1983; McAllister et al., 1990), *Klebsiella* sp K18 (Uekane, 1993) e *Erwinia* sp D12 (Celestino, 1998) capazes de converter sacarose em isomaltulose com alto rendimento.

4.2. OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES A PARTIR DA LINHAGEM *Erwinia* sp D12.

Os microrganismos mutantes obtidos de acordo com as técnicas de mutação descritas nos itens 3.2.1 e 3.2.2 não apresentaram maior atividade de glicosiltransferase em relação a cepa original (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4. Obtenção de cepas mutantes de *Erwinia* sp D12 após radiação ultravioleta.

Tempo de incidência da radiação UV (min)	Placas sem meio (suspensão dos microrganismos em água)				Placas com meio (microrganismos semeados em placa de meio sólido)			
	Tempo de fermentação (h)				Tempo de fermentação (h)			
	5	10	15	24	5	10	15	24
Atividade de glicosiltransferase (unidades de atividade/mL de meio de cultura)								
Controle	1,07	2,10	1,45	1,18	1,07	2,10	1,45	1,18
0,5	*	*	-	-	0,19 0,16	1,10 1,08 1,00 0,77 1,87 1,86 0,34	-	1,08 0,47 0,91
1	-	1,60 1,39 1,25	-	-	-	-	-	1,05 0,98 1,11
2	-	-	-	-	-	1,49	-	0,98 1,40
5	0,33 0,20 0,89 0,23 0,10 0,46	-	-	-	-	-	1,34	-
10	-	-	-	-	-	-	1,41	0,55
15	-	-	-	-	-	-	1,37	
20	-	-	-	-	-	-	-	0,65
30	-	-	-	-	-	1,56	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-

O sinal (-) indica não crescimento de colônias e o sinal (*) crescimento de muitas colônias. Mais de um valor na mesma célula da tabela indicam valores medidos para diferentes colônias.

TABELA 5. Atividade de glicosiltransferase das linhagens mutantes obtidas após tratamento do microrganismo *Erwinia* sp D12 com o reagente metil-N-nitroso-guanidina (MNNG).

Número de linhagens	Atividade de glicosiltransferase (unidades de atividade/mL de meio de cultura)
1	0,80
2	1,54
3	1,82
4	1,38
5	0,65
6	1,84
7	1,69
8	0,33
Linhagem parental (controle)	1,87

Tate & Lyle (1981), estudando a produção de isomaltulose através de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 e objetivando um aumento da produção da enzima glicosiltransferase a partir deste microrganismo, utilizou o reagente mutagênico metil-N-nitroso-guanidina. Os autores verificaram que as linhagens mutantes não apresentaram maior atividade de glicosiltransferase que a linhagem parental.

Posteriormente Cheetham et al. (1985), obtiveram linhagens mutantes com maior produção de glicosiltransferase, mas a produção tendia a diminuir e os experimentos não foram continuados.

4.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE OU MELAÇO NO MEIO DE CULTURA, NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA LINHAGEM *Erwinia* sp D12.

Os dados obtidos através do estudo da influência das concentrações de melaço (0-10% de sólidos solúveis totais) e sacarose (0-10%), realizado de acordo com o item 3.4.1, demonstraram que houve um aumento na atividade da enzima glicosiltransferase, em função do aumento da concentração de melaço e sacarose no meio de cultura, em todos os tempos de fermentação analisados. No meio de cultura contendo sacarose, o aumento da atividade da glicosiltransferase não foi tão efetivo quanto no meio contendo melaço (Tabela 6), provavelmente pelo fato do melaço ser um meio de cultura complexo. Portanto, um experimento posterior foi realizado utilizando-se concentrações de melaço 0-20% (sólidos solúveis totais), de acordo com o item 3.4.1, no qual observou-se que a atividade enzimática da linhagem *Erwinia* sp D12 é influenciada pelo tempo de fermentação e pela concentração de melaço do meio de cultura (Tabela 7). Nas condições experimentais utilizadas, a linhagem *Erwinia* sp D12 apresentou maior atividade de glicosiltransferase (12,46 unidades de atividade/mL de meio de cultura), quando utilizou-se melaço na concentração de 12% de sólidos solúveis totais e após 15 horas de fermentação (Tabela 7). Acima desta concentração a atividade diminuiu, chegando a nula em todos os tempos de fermentação utilizados, devido à inibição do crescimento microbiano em altas concentrações de açúcares. O efeito inibitório de concentrações elevadas de substrato está relacionado, em células vivas, a fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise. As possíveis razões para o fenômeno são a repressão na síntese de enzima e a desidratação dos sistemas enzimáticos devido a perda de água da célula ou à inibição do transporte de nutrientes para o seu interior. A célula viva polui seu ambiente com produtos do seu metabolismo até cessar o crescimento e, eventualmente, perder a sua viabilidade, fenômeno conhecido como inibição pelo produto.

O melaço ou sacarose são principalmente fontes de carbono e energia para os microrganismos. Acredita-se que as linhagens produtoras de glicosiltransferase, promovam a isomerização ou transglicosilação da sacarose em isomaltulose, como um método de sequestrar irreversivelmente carbono e energia numa forma menos usada pela planta

hospedeira e por outros microrganismos as quais poderiam competir pela sacarose. Esta hipótese é suportada pelo fato de que ‘in vitro’ a atividade de invertase de leveduras foi inibida pela isomaltulose, prevenindo assim a utilização da sacarose (Bornke et al., 2001).

TABELA 6. Influência da concentração de sacarose (0-10%) ou de melaço (0-10% de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de fermentação.

Concentração de melaço ou sacarose (%)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)					
	6 horas		15 horas		24 horas	
	Melaço	Sacarose	Melaço	Sacarose	Melaço	Sacarose
0	-	-	-	-	-	-
2	3,32	3,73	2,44	3,50	3,02	3,94
4	4,66	5,08	4,45	3,88	4,76	4,82
6	6,30	4,90	6,69	5,60	5,80	5,13
8	7,93	5,74	7,77	6,10	7,50	5,52
10	9,08	6,69	8,67	5,90	8,50	6,80

TABELA 7. Influência da concentração de melaço (0-20% de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de fermentação.

Concentração de melaço (%)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)		
	6 horas	15 horas	24 horas
0	-	-	-
2	3,69	3,85	3,05
4	5,93	6,43	4,16
6	6,44	6,44	5,18
8	8,42	8,80	7,50
10	10,42	10,93	8,93
12	10,28	12,46	10,89
14	-	9,07	9,50
16	-	-	-
20	-	-	-

Celestino (1998) e Uekane (1993), verificaram que a concentração de sacarose é importante para a síntese de glicosiltransferase a partir de *Erwinia* sp D12 e *Klebsiella* sp K18, quando utilizaram meio de cultura contendo 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e concentrações variadas de sacarose. A maior atividade foi obtida com 4% de sacarose para a linhagem K18 e 6% para a linhagem D12, sendo que atividade também diminuiu em concentrações maiores de açúcares.

Bando & Sato (1997), estudando a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes meios de cultura, obtiveram maior produção de glicosiltransferase (6,67 unidades de atividade/mL do meio de cultura) em um meio constituído de 1% de peptona, 0,1% de extrato de carne, 0,3% de cloreto de sódio e 10% de melaço (6% de açúcares redutores totais), após 15 horas de fermentação a 30°C.

Huang et al. (1998), verificaram que a sacarose e a frutose são excelentes fontes de carbono e energia para induzir a formação de células de *Klebsiella planticola* com alta habilidade para formação de isomaltulose. O experimento foi conduzido com sacarose, devido ao baixo custo, sendo que a máxima atividade da enzima foi obtida com 7% de sacarose e permaneceu constante acima de 10% de sacarose no meio de cultura.

4.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA LINHAGEM *Erwinia* sp D12.

Através do estudo do efeito da concentração de peptona no meio de cultura, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, conduzido de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2, observou-se que o aumento da concentração de peptona estimula a produção de glicosiltransferase até atingir um ótimo de produção, provocando, posteriormente, uma diminuição da atividade em concentrações acima da ideal (Tabela 8). A maior produção de enzima glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 (12,80 unidades de atividade/mL de meio de cultura) foi obtida em meio de cultura contendo peptona 4%, melação (12% de sólidos solúveis totais) e de extrato de carne 0,4%, após 15 horas de fermentação. A Tabela 8 ilustra os resultados obtidos.

TABELA 8. Influência da concentração de peptona no meio de cultivo, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de fermentação.

Concentração de peptona (%)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)	
	15 horas de fermentação	15 horas de fermentação
0	0,001	—
2	4,36	10,42
4	5,88	12,80
6	4,08	9,09
8	4,44	5,64
10	4,62	5,34

Celestino (1998), trabalhando com *Erwinia* sp D12, e Uekane (1993), com *Klebsiella* sp K18, obtiveram produção máxima de glicosiltransferase intracelular após 24 horas de fermentação, a 30°C (0,76 e 0,167 unidades de atividade/mL de sobrenadante da massa celular sonicada) respectivamente. Nestes estudos o cultivo da linhagem D12 foi realizado em um meio de cultura contendo 6% de peptona, 6% de sacarose e 0,4% de extrato de carne e o da linhagem K18 em um meio contendo 1% de peptona, 4% de sacarose e 0,4% de extrato de carne.

Huang et al. (1998), obtiveram células de *Klebsiella planticola* com maior atividade de glicosiltransferase em meios contendo fonte de nitrogênio orgânica do que em meios com fonte inorgânica de nitrogênio em estudos de conversão de sacarose em isomaltulose.

4.5. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DA LINHAGEM *Erwinia* sp D12 E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 28°C, 30°C E 32°C.

Os resultados obtidos no experimento realizado para estudar o crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, de acordo

com o item 3.4.3, demonstraram que a atividade enzimática da glicosiltransferase da *Erwinia* sp D12 é influenciada pela temperatura e pelo tempo de fermentação (Tabela 9). A maior atividade apresentada (15,61 unidades de atividade/mL de meio de cultura) foi a 30°C após 8 horas de fermentação (Tabela 9). Em temperaturas acima (32°C) ou abaixo (28°C) da ideal, verificou-se uma diminuição da atividade, assim como houve uma diminuição gradativa da atividade de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 em função do aumento do tempo de fermentação, sendo que após 48 horas de fermentação a 30°C a atividade diminuiu para 9,40 unidades de atividade/mL de meio de cultura. O período de maior atividade de glicosiltransferase pela *Erwinia* sp D12 coincidiu com a fase exponencial do seu crescimento, caracterizando a enzima como um metabólito primário.

Cheetham et al. (1985) relataram que a enzima presente em células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas, responsável pela formação de isomaltulose a partir de sacarose, está localizada no espaço periplásmico das células.

Egerer (1994), estudando a produção de isomaltulose a partir da enzima sacarose mutase de *Protaminobacter rubrum*, verificou que o tempo ótimo de fermentação, no qual a enzima apresentou maior atividade, foi de 8 horas, na fase logarítmica de crescimento celular. Isto pode ser explicado pela formação periplásmica da sacarose mutase durante o crescimento celular e pela mudança estrutural das proteínas nas fases finais de crescimento e nas células velhas.

TABELA 9. Influência da temperatura e do tempo de fermentação na atividade da glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12, durante a fermentação em um meio contendo melação (12% de sólidos solúveis totais), extrato de carne 0,4 % e de peptona 4%.

Tempo de fermentação	28°C			30°C			32°C		
	Atividade U/mL	Massa celular Abs 660nm	pH	Atividade U/mL	massa celular Abs 660nm	pH	Atividade U/mL	Massa celular Abs 660nm	PH
0	0,64	0,77	5,78	1,80	0,76	5,58	0,86	0,68	5,86
2	0,68	1,08	6,03	2,20	1,25	5,75	1,14	1,06	5,85
4	2,73	2,06	5,86	5,07	2,60	5,60	3,26	1,70	5,61
6	13,11	3,43	5,60	14,55	4,19	5,56	3,30	1,70	5,33
8	13,59	3,70	5,56	15,61	4,31	5,69	5,62	3,00	5,63
10	13,89	3,71	5,57	13,94	4,45	5,55	5,76	2,90	5,46
12	11,22	3,66	5,48	12,72	4,76	5,42	4,88	3,31	5,36
14	13,02	3,50	5,42	11,59	4,65	5,35	4,82	3,13	5,32
16	13,20	3,82	5,39	11,23	4,67	5,31	5,03	3,32	5,28
24	11,32	3,96	5,32	11,24	3,25	5,24	4,88	3,19	5,25
36	9,14	3,99	5,31	10,94	3,67	5,20	5,51	3,80	5,61
48	10,53	4,05	5,32	9,40	3,53	5,12	5,62	3,90	5,57

Bando & Sato (1997), estudando a produção de glicosiltransferase em um fermentador de 2 litros, contendo um meio de cultura constituído de 1% de peptona, 0,1% de extrato de carne, 0,3% de cloreto de sódio e 10% de melação (6% de açúcares redutores totais), obtiveram produção máxima (8,47 unidades de atividade/mL do meio de cultura) após 6 horas de fermentação a 30°C. Após este período, observou-se uma diminuição da atividade, sendo que em 24 horas de fermentação a atividade atingiu 4,98 unidades de atividade/mL do meio de cultura.

Utilizando-se um meio de cultura constituído de 40 g/L de sacarose, 10 g/L de peptona e 4,0 g/L de extrato LabLemco, McAllister et al. (1990) verificaram que a

produção máxima de glicosiltransferase intracelular na fermentação de *Serratia plymuthica* ATCC 15298 ocorria a 30°C e após 16 horas de fermentação.

Uekane (1993), verificou que na fermentação de *Klebsiella* sp K18 em meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne a 30°C, a glicosiltransferase intracelular foi produzida na fase exponencial de crescimento, atingindo a atividade máxima de 0,167 unidades/mL de meio de cultura após 24 horas de fermentação, permanecendo constante até cerca de 32 horas. Após este período, observou-se diminuição da atividade intracelular, sendo que após 80 horas de fermentação, a atividade foi de aproximadamente 0,097 unidades/mL de meio de cultura. Na fermentação a 36°C, a produção de glicosiltransferase intracelular alcançou atividade máxima de 0,082 unidades/mL de meio de cultura após 24 horas de fermentação, diminuindo rapidamente após 32 horas de fermentação.

Foi relatado por Nagai-Miyata et al. (1993), que a produção máxima de α -glicosiltransferase pela linhagem *Agrobacterium radiobacter* MX-232, que converte sacarose principalmente em trealulose, ocorre após 60 horas de fermentação em meio composto de 0,1% de extrato de carne, 1% de peptona, 0,3% de cloreto de sódio, 0,1% de extrato LabLemco e 6% de melação ajustado a pH 7,0.

As Figuras 7, 8 e 9 ilustram respectivamente a relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C, 30°C e 32°C.

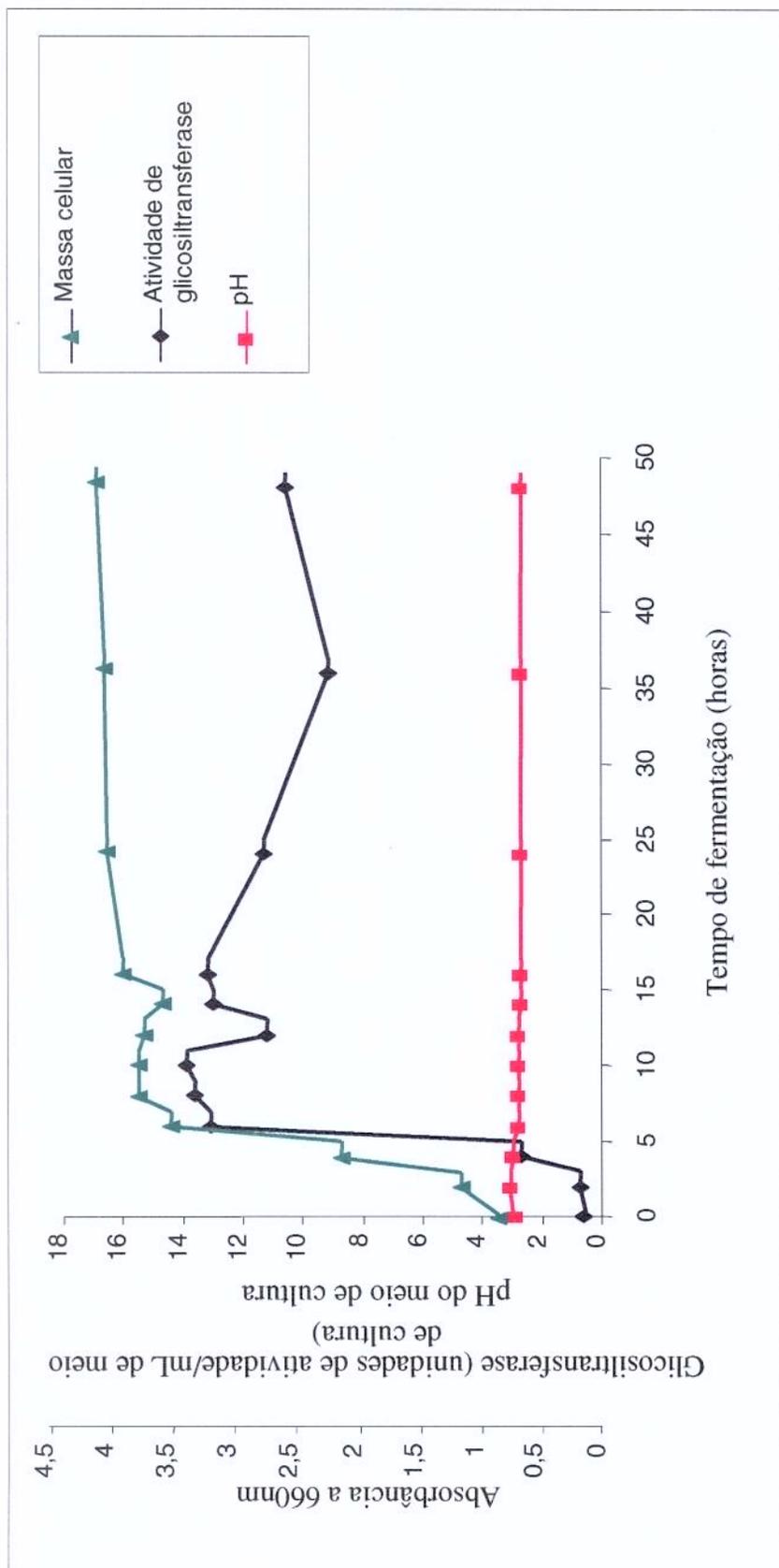


FIGURA 7 – Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 e produção de glicosiltransferase a 28°C.

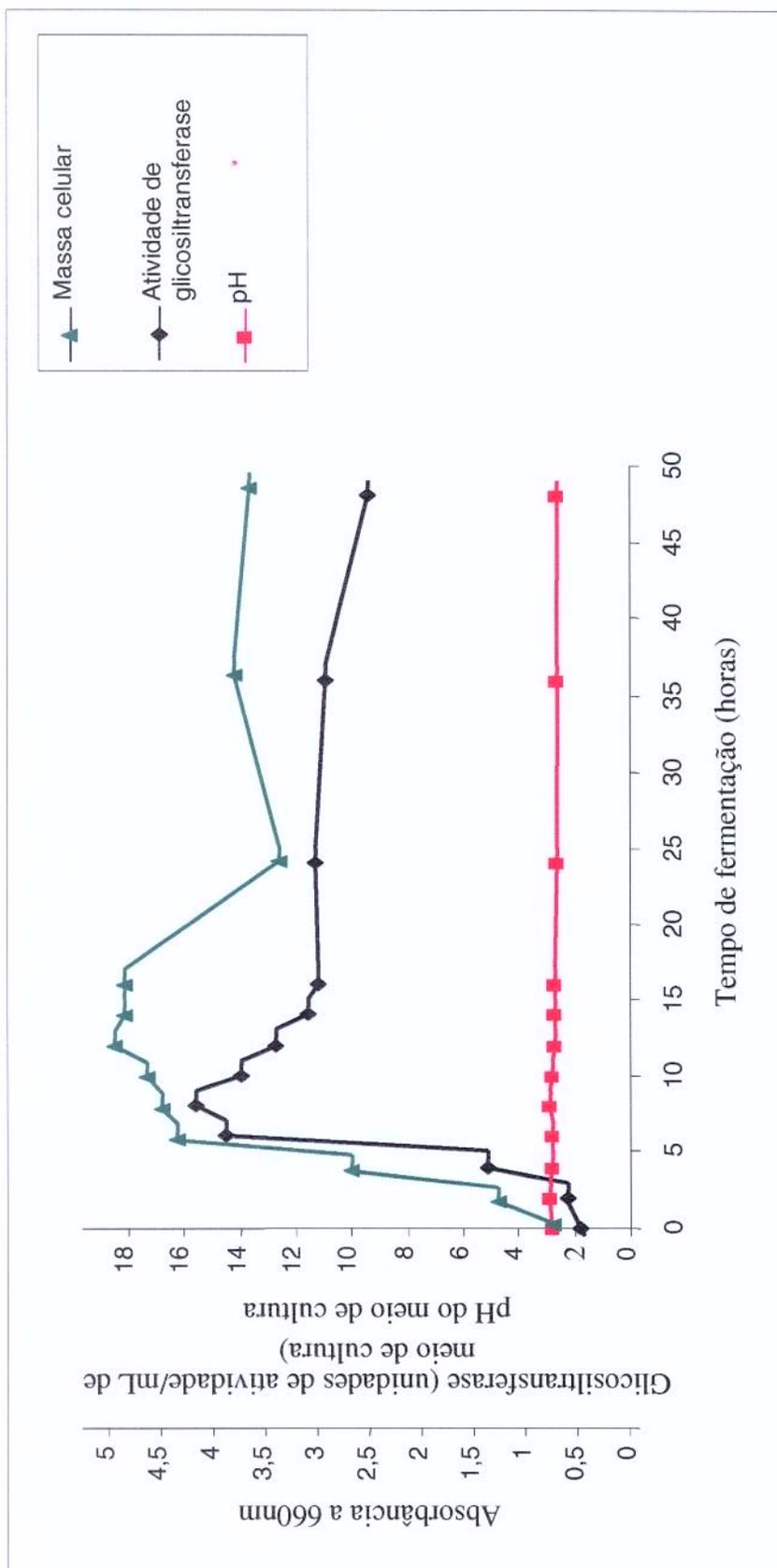


FIGURA 8 – Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 e produção de glicosiltransferase a 30°C.

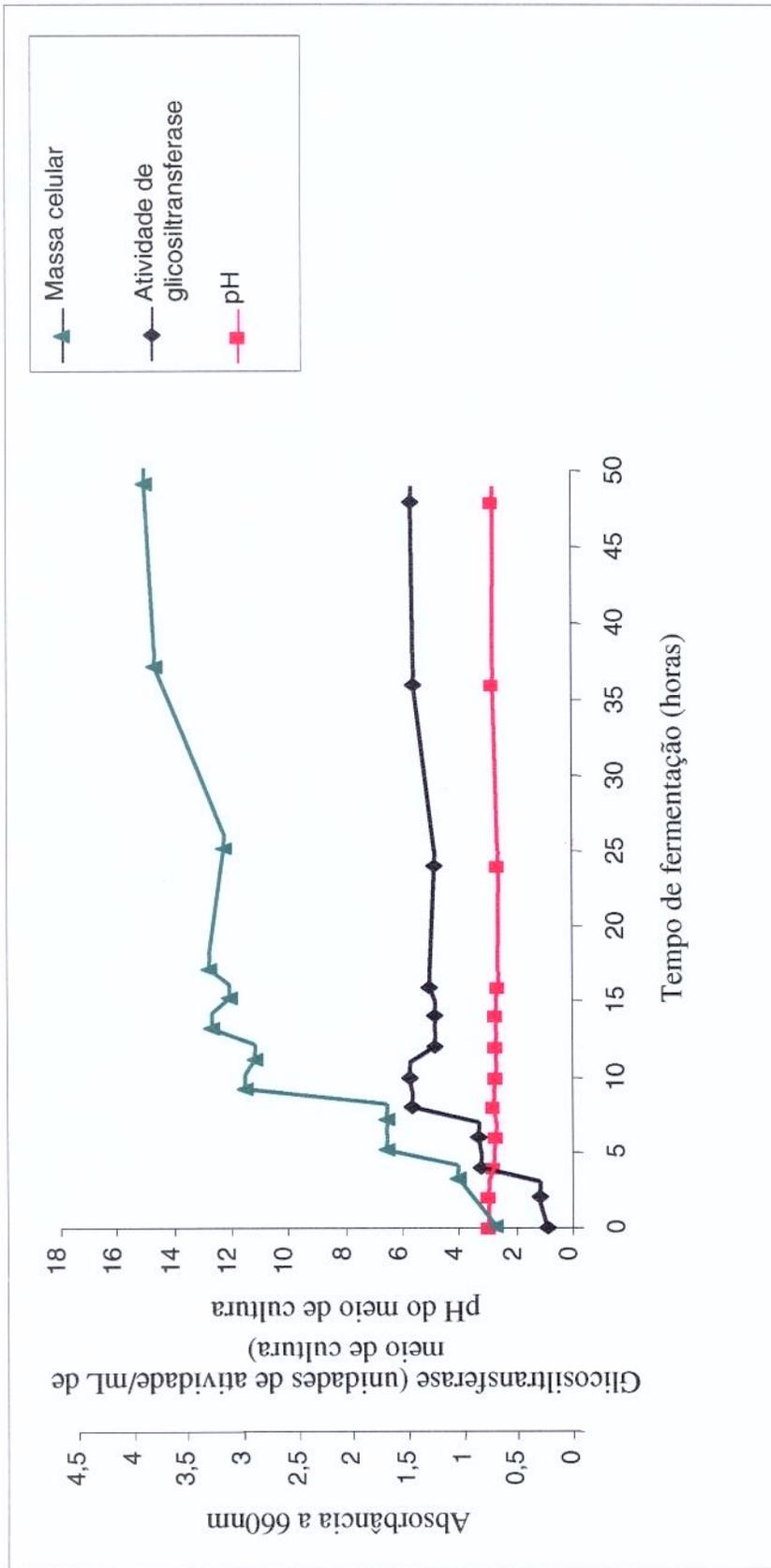


FIGURA 9 – Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 e produção de glicosiltransferase a 32°C.

Através da análise das figuras 7, 8 e 9 pode-se verificar que a enzima glicosiltransferase intracelular de *Erwinia* sp D12 foi produzida na fase exponencial de crescimento em todas as temperaturas testadas, atingindo a atividade máxima após 8hs de fermentação a 30°C e após 10hs a 28°C e 32°C. A máxima atividade de glicosiltransferase nas diferentes temperaturas foi de 15,61 unidades de atividade/mL de meio de cultura a 30°C, de 13,89 a 28°C e de 5,76 a 32°C. Estes resultados demonstraram que temperaturas acima da ideal possuem maior influência na diminuição da atividade de glicosiltransferase do que temperaturas abaixo da ideal, provavelmente pelo fato da glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp D12 ser termosensível. Após 48hs de fermentação a atividade de glicosiltransferase diminuiu em todas as temperaturas. O pH do meio de fermentação manteve-se entre 5 e 6 durante todo o período da fermentação nas três temperaturas testadas.

Estes resultados foram compatíveis com Celestino (1998), que estudando a influência da temperatura e do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 durante a fermentação em meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 6% de peptona e 0,4% de extrato de carne, verificou que a produção máxima de glicosiltransferase em todas as temperaturas testadas (28°C, 30°C e 35°C) ocorreu na fase exponencial de crescimento, sendo que a atividade de glicosiltransferase foi maior na temperatura de 28°C, atingindo 2,22 unidades/mL de meio de cultura, ocorrendo diminuição da atividade com o aumento da temperatura. O pH do meio de fermentação manteve-se entre 5,5 e 6,5.

4.6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO E DA TEMPERATURA NO RENDIMENTO DE ISOMALTULOSE UTILIZANDO-SE CÉLULA IMOBILIZADA DE *Erwinia* sp D12.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do rendimento de isomaltulose (variável dependente), obtidos nos ensaios.

TABELA 10. Resultados dos ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, realizados de acordo com o Planejamento Experimental.

Ensaios	Temperatura (°C)	Concentração de sacarose (%)	Rendimento de isomaltulose (%)
1	26,5	19,4	40,30
2	33,5	19,4	56,38
3	26,5	53,1	29,14
4	33,5	53,1	30,10
5	25	36,25	47,23
6	35	36,25	51,47
7	30	12,5	46,82
8	30	60	31,34
9 (C)	30	36,25	39,91
10 (C)	30	36,25	39,91
11(C)	30	36,25	40,43

C: ensaio no ponto central.

Analisando-se os efeitos das duas variáveis independentes temperatura e concentrações de sacarose, foram obtidos os valores de 6,65 para a estimativa do efeito da temperatura e - 3,62 para o estudo do efeito da concentração de sacarose. Estes resultados indicam que quando a temperatura variou de 25 a 35°C ocorreu um aumento médio no rendimento de isomaltulose de 6,65 e quando a concentração de sacarose variou de 12,5 para 60% observou-se uma redução média de 3,62 no rendimento de isomaltulose. O efeito de interação entre temperatura e concentração de sacarose foi significativo e negativo, ou seja, a interação não favorece a produção de isomaltulose (Tabela 11).

TABELA 11. Estimativa dos efeitos para produção de isomaltulose.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t (2)	P	- 95% Limite de confiança	95% Limite de confiança
Média*	40,0844	0,1733	231,2561	0,000019	39,3386	40,8302
Temperatura (L)*	5,7597	0,2123	27,1294	0,001356	4,8462	6,6732
Temperatura (Q)*	6,6495	0,2527	26,3111	0,001441	5,5621	7,7369
Concentração de sacarose (L)*	-14,8344	0,2123	-69,8731	0,000205	-15,7479	-13,9209
Concentração de sacarose (Q)*	-3,6236	0,2527	-14,3381	0,004829	-4,7110	-2,5362
Temperatura X sacarose*	-7,5600	0,3032	-25,1814	0,001573	-8,8518	-6,2682

(L)= linear; (Q)= quadrático. * Significativo ao nível de 5%.

A análise de variância dos resultados dos ensaios do planejamento experimental está apresentada na Tabela 12.

TABELA 12. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se célula imobilizada de *Erwinia* sp D12 em função da concentração de substrato e da temperatura.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	F5%
Regressão	675,7068	5	135,1414	6,84	5,05
Resíduo	98,7455	5	19,7491		
Falta de ajuste	98,5652	3	32,8551	364,45	19,16
Erro puro	0,1803	2	0,09015		
TOTAL	774,4523	10	77,4452		

SQ = soma quadrática; GL = número de graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F calculado; F_{5%} = valores críticos de F ao nível de 5%.

Analisando-se a tabela ANOVA acima pode-se verificar que a regressão foi significativa ($p \leq 0,05$), pois o valor de F calculado foi maior que o tabelado, mas não foi preditiva pois o valor obtido não foi superior a seis vezes o valor de F calculado. O modelo apresentou também falta de ajuste significativa ($p \leq 0,05$). Porém, o erro experimental não foi significativo.

O modelo obtido foi o seguinte: $Y = 196.679686 - 13.071999X + 1.942440Z + 0.270200X^2 - 0.064095XZ - 0.006354Z^2$, onde X= temperatura; Z= sacarose e Y= rendimento de isomaltulose.

O modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8725 a $p \leq 0,05$, ou seja, pelo menos 87,25% da variação do rendimento de isomaltulose foi explicado pelo modelo

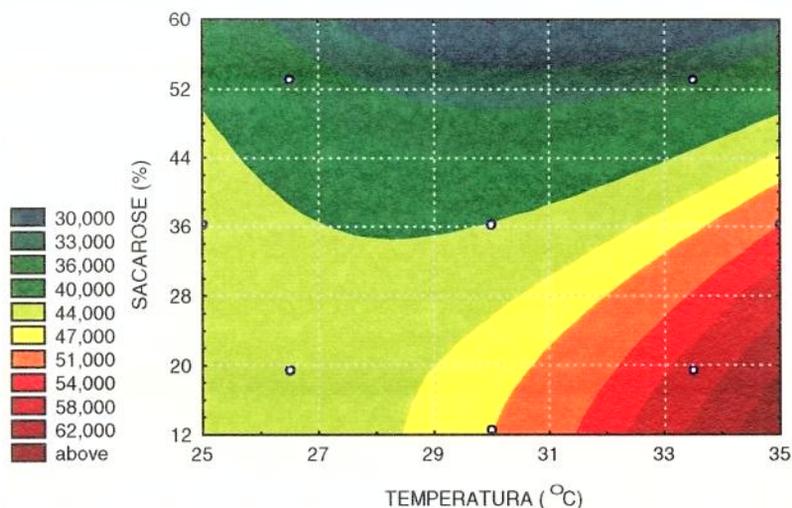


FIGURA 10 - Curva de contorno referente ao rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose.

Analisando-se a curva de nível obtida para o rendimento de isomaltulose (Figura 10), pode-se verificar que não foi possível encontrar um ponto ótimo global de rendimento de isomaltulose (a falta de ajuste foi significativa a 5%), em função da variação da temperatura e da concentração de sacarose. O rendimento de isomaltulose tende a aumentar com a diminuição da concentração de sacarose e com o aumento da temperatura. Na região experimental estudada constatou-se que na faixa de 20 a 30% de sacarose, o rendimento de isomaltulose situa-se em torno de 50% de conversão, sendo levemente influenciado pelo aumento da temperatura. Verificou-se também que concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40%) afetam a atividade da célula imobilizada devido ao efeito inibitório. Para estimar a região de máximo rendimento de isomaltulose realizou-se uma análise canônica, através da qual confirmou-se que a forma de superfície era de sela e, posteriormente, efetuou-se “Ridge analysis” para estimar a futura região experimental onde o máximo rendimento ocorreria. Através dos resultados obtidos (Anexo 1), observou-se que a faixa de máximo rendimento situa-se entre 20 a 30% de sacarose com uma pequena influência de temperaturas mais altas. Portanto, testou-se um novo experimento em fatorial completo 2x3, utilizando-se concentrações de 20 a 30% de sacarose e temperaturas de 35 a 40°C.

TABELA 13. Rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em função da temperatura e concentração de sacarose do experimento em fatorial completo 2x3.

Temperatura (°C)	Concentração de sacarose (%)	Isomaltulose (%)
35	20	46,12
35	25	45,8
35	30	48,34
40	20	44,64
40	25	47,05
40	30	50,92

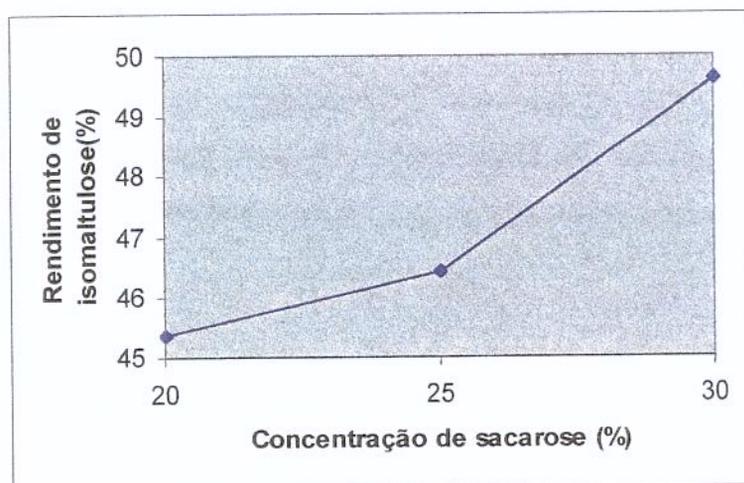


FIGURA 11 – Rendimento de isomaltulose em função da concentração de sacarose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12.

TABELA 14. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em função da concentração de substrato (20-30%) e da temperatura (35-40°C), para o experimento fatorial completo 2x3.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Sacarose	2	19,62491	9,812455	6,102763	0,035797
Temperatura	1	1,84868	1,84868	0,574883	0,477040
Sac X Temp	2	4,28657	2,143285	1,332997	0,331893
Erro	6	3,215742	0,535957		

SQ = soma quadrática; GL = número de graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F calculado; F_{5%} = valores críticos de F ao nível de 5%.

Através da ANOVA acima referente ao experimento fatorial completo 2x3, verificou-se que a temperatura não teve efeito significativo no rendimento de isomaltulose, mas houve um efeito significativo ($p \leq 0,05$) da concentração da sacarose, ou seja, quanto maior a quantidade de sacarose, maior o rendimento de isomaltulose na faixa experimental estudada (Tabela 13). O aumento do rendimento de isomaltulose em função da concentração da sacarose não foi na mesma proporção para cada acréscimo na quantidade de sacarose, ocorrendo uma maior variação em concentração maiores de sacarose (Figura 11).

Esta influência da concentração de sacarose na atividade de glicosiltransferase também foi verificada no experimento desenvolvido por Tate & Lyle (1981), com células imobilizadas de *Erwinia raphontici* e concentrações de sacarose de 12,5 a 60% a 30°C. Os autores verificaram que a maior atividade obtida (1.18 g produto/peso de células/hora) situa-se em torno de 35% de sacarose com uma vida média de 415 horas e que em 55% de sacarose a atividade diminuiu chegando a 0,82g produto/peso de células/hora, mas a vida média aumentou para 4000 horas.

De acordo com Cheetham (1987), o excesso de concentração de sacarose possui poder inibitório sobre a célula imobilizada, mas pode aumentar a estabilidade da mesma.

Portanto, o aumento na estabilidade da célula imobilizada com o aumento da concentração da sacarose compensa a diminuição da atividade, uma vez que a produtividade da coluna aumenta. Alta concentração de sacarose promove um equilíbrio entre isomaltulose e sacarose favorecendo a formação de isomaltulose, reduz a formação de gases e ácidos como subprodutos, reduz a atividade de proteases endógenas e tende a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

O aumento da estabilidade das células imobilizadas em função do aumento da concentração de sacarose pode ser devido a estabilização pelo produto ou pelo produto e substrato e pela imposição de restrições difusionais no suprimento de substrato para as células imobilizadas. A estabilidade também pode estar relacionada com a baixa taxa de metabolismo endógeno das células ou com a sua plasmólise promovida pela alta concentração de sacarose (Cheetham, 1987).

Os resultados obtidos foram compatíveis com Xyrofin Oy (2000a), que também verificou que a transformação enzimática da sacarose em isomaltulose através de células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e de *Erwinia rhapsontici* em DEAE-celulose modificada é influenciada pela temperatura, concentração de sacarose e fluxo do substrato através da coluna. Os autores constataram que a reação é preferivelmente efetuada em uma coluna empacotada a 30°C com solução de sacarose 25% em fluxos lentos. Temperaturas de 35 a 45°C comprovaram ser parcialmente inativantes, e temperaturas acima de 55°C inativaram totalmente a coluna de *Protaminobacter rubrum* em 24 horas. A concentração de sacarose deve ser mantida preferivelmente entre 25 e 35%. Observou-se que concentrações de sacarose acima de 55% reduzem de modo significativo a conversão em um curto período de tempo. Os melhores resultados com células de *Protaminobacter rubrum*: isomaltulose 79%, trealulose 0,9%, frutose 0,4%, glicose 0,6% e sacarose 18,5%, foram obtidos quando utilizou-se solução de sacarose 25% a 30°C e com um fluxo de 0,08 volume do leito por hora. Células de *Serratia plymuthica* produziram: isomaltulose 80%, trealulose 7,5%, frutose 5,5%, glicose 3% e as de *Erwinia rhapsontici* produziram: isomaltulose 79%, trealulose 15%, frutose 0,5% e glicose 0,5%, quando

utilizaram soluções de sacarose a 25% a 30°C com fluxos de 0,12 e 0,02 volume do leito por hora, respectivamente.

Os rendimentos de conversão de sacarose para isomaltulose, apresentados por Xyrofin Oy (2000a), são maiores que o obtido neste experimento, provavelmente devido a utilização de uma vazão menor de substrato através da coluna, permitindo um tempo de contato maior do substrato com as células imobilizadas. Os resultados demonstrados por Xyrofin Oy (2000a) foram obtidos usando vazões de 0,02 com células de *Erwinia rhapontic*, 0,08 para *Protaminobacter rubrum* e 0,12 para *Serratia plymuthica* do volume vazio da coluna por hora, sendo que o utilizado na conversão enzimática da sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 foi de 0,24 do volume vazio da coluna por hora.

Meito Sangyo (1990), também verificou que a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Klebsiella* sp n° 88 deve ser realizada, utilizando-se preferencialmente concentrações de sacarose entre 30 e 40% em temperaturas de 30 a 37°C por cerca de 20 a 40 horas. Em uma coluna de 300mL, contendo 200 mL de células imobilizadas de *Klebsiella* sp n° 88 em carragenina, polietilenimina e glutaraldeído o autor introduziu uma solução de sacarose 40% com temperatura entre 30-37°C. Nestas condições o autor obteve uma conversão de 85% de isomaltulose e 15% de trealulose.

A forma mais utilizada para a condução de bioprocessos é a batelada simples. O principal problema desta forma de operar bioprocessos é decorrente de fenômenos de inibição pelo substrato, produto, ou outros metabólitos.

A Tabela 15 ilustra os açúcares formados durante a conversão enzimática da sacarose em isomaltulose, podendo verificar que além de isomaltulose detectou-se glicose, frutose, sacarose e outros açúcares, que podem ser trealulose, isomaltose e isomelizitose. De acordo com Cheetham (1984), a enzima que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose é sacarose específica, mas catalisa uma reação não seletiva, produzindo simultaneamente isomaltulose e trealulose. Fuji et al. (1983), detectaram trealulose, isomaltose e isomelizitose como subprodutos da síntese de isomaltulose a partir da sacarose por *Serratia plymuthica*, e Xyrofin Oy (2000a) detectou isomaltulose e trealulose

utilizando células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapontici*.

Segundo Cheetham (1984), a isomaltulose é o produto cineticamente favorecido e a trealulose o termodinamicamente, pelo mecanismo de ação da glicosiltransferase de *Erwinia rhapontici*, sendo que um pequeno mas contínuo declínio na concentração inicial de isomaltulose e correspondente aumento de trealulose pode ocorrer, quando utiliza-se um grande período de incubação. Não foi formado sacarose quando isomaltulose ou trealulose purificadas foram incubadas com a enzima. Mas de acordo com Cheetham (1987), isomaltulose mas não trealulose, pode ser convertida a sacarose pela reação reversa.

De acordo com Egerer (1994), a produção de isomaltulose é favorecida e a formação dos subprodutos é reduzida, pela diminuição do tempo de incubação da solução de sacarose no biorreator. A taxa de glicose/frutose diminuiu significativamente com o aumento da temperatura independente da concentração de sacarose.

Mitsui Sugar & Suedzucker AG (1992), verificaram que no processo de conversão da sacarose em isomaltulose e trealulose, através de enzimas de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 imobilizadas em temperaturas entre 15-35°C, a formação de isomaltulose e a liberação dos monossacarídeos foi maior a medida que se aumentou a temperatura e a formação de trealulose foi favorecida em temperaturas menores.

Nagai-Miyata et al. (1993), verificaram que a composição dos produtos resultante da ação de células imobilizadas de *Agrobacterium* MX- 232 no substrato sacarose foi afetada pela temperatura e concentração de sacarose, sendo que o efeito da temperatura foi mais evidente.

TABELA 15. Efeito da temperatura e concentração de sacarose na conversão enzimática da sacarose em isomaltulose e formação de subprodutos pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp D12.

Temperatura (°C)	Concentração de sacarose (%)	Porcentagem (%) de açúcares				
		Isomaltulose	Sacarose	Glicose	Frutose	Outros açúcares
26,5	19,4	40,30	21,78	0,40	0,20	37,32
33,5	19,4	56,38	17,02	0,42	0,64	25,54
26,5	53,1	29,14	35,25	0,53	1,07	34,01
33,5	53,1	30,10	26,44	0,84	1,56	41,06
25	36,25	47,23	28,31	0,34	0,76	23,36
35	36,25	51,47	22,56	0,50	1,03	24,44
30	12,5	46,82	19,23	0,33	0,33	33,29
30	60	31,34	23,07	0,55	1,10	43,94
30	36,25	39,91	18,21	0,45	0,90	40,53
30	36,25	39,91	18,21	0,45	0,91	40,52
30	36,25	40,43	20,39	0,46	0,92	37,80

A Figura 12 ilustra a cromatografia dos açúcares resultantes da conversão enzimática da sacarose pela linhagem *Erwinia* sp D12 a partir de uma solução de sacarose 30% a 35°C. Através da análise cromatográfica e por comparação do tempo de retenção apresentado pelas soluções padrões de glicose (3,10), frutose (3,34), sacarose (5,06) e isomaltulose (6,32), concluiu-se que os picos obtidos na figura 12 correspondem respectivamente aos açúcares glicose, frutose, sacarose e isomaltulose.

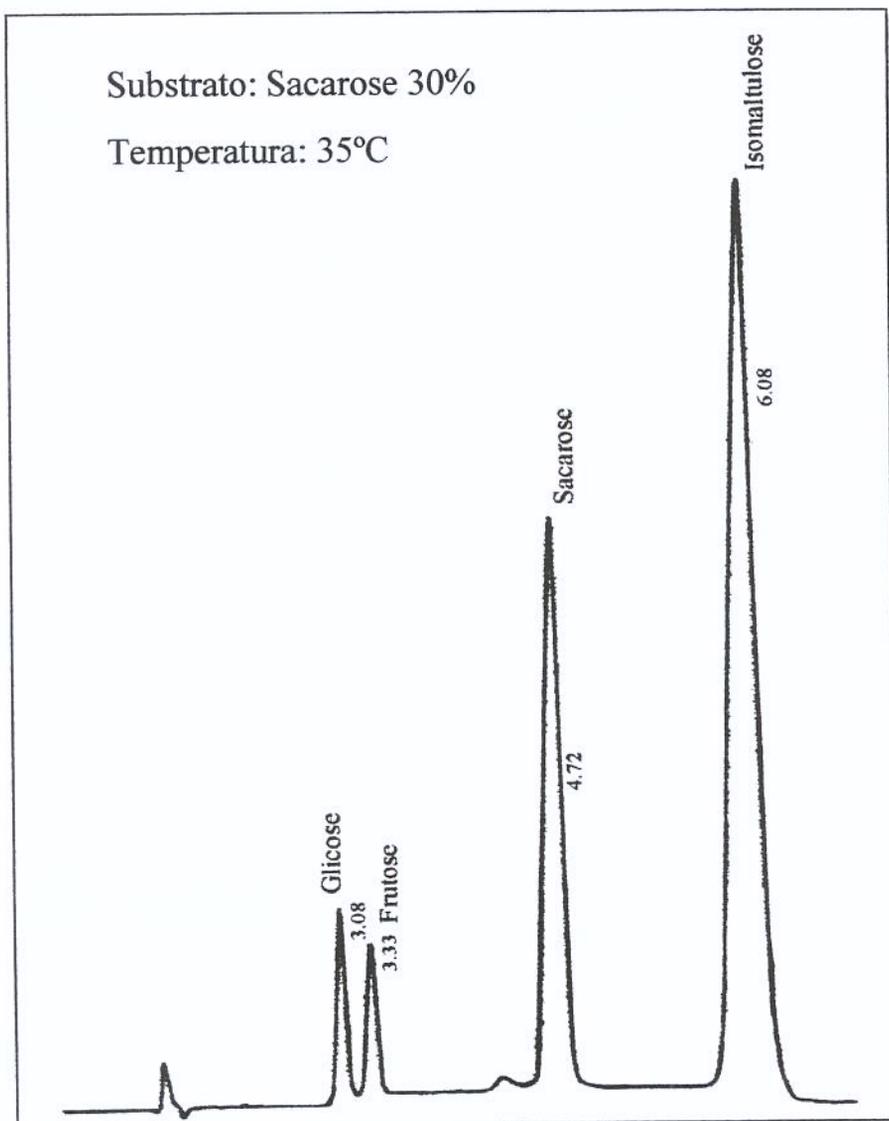


FIGURA 12 – Cromatografia líquida em coluna carbo Pac Pal dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pela enzima glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio.

4.7. PURIFICAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DA ISOMALTULOSE.

Nos experimentos realizados foram obtidos xaropes cujas as características são mostradas na Tabela 16.

TABELA 16. Características do xarope de isomaltulose obtido após conversão enzimática da sacarose e durante o processo de purificação após tratamento com terra diatomácea e resinas de troca iônica.

	Xarope de isomaltulose obtido após conversão enzimática da sacarose.	Xarope tratado com terra diatomácea.	Xarope tratado com resina de troca iônica.
Volume	2L	2L	2,5L
Grau Brix	21,8°B	21°B	14,5°B
pH	4,04	4,15	8,0
Condutividade	2,16 ms/cm	2,11 ms/cm	2,1 µs/cm
Cloreto	Acima de 300 ppm	Acima de 300 ppm	Ausência
Sódio	Presente	Presente	Ausente
Cálcio	Presente	Presente	Ausente

A presença dos íons cloreto, sódio e cálcio no xarope obtido após conversão enzimática da sacarose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, foi devido ao processo de imobilização celular, no qual é utilizado alginato de sódio e cloreto de cálcio. Cheetham (1987) utilizou resina aniônica (Amberlite IRA 93) e uma catiônica (Amberlite 200) e Meito Sangyo (1990) utilizou resina IR 120b e IRA-411 (Organo Co.) para a deionização do xarope. De acordo com Xyrofin Oy (2000a) a isomaltulose pode ser purificada por troca iônica, através da remoção de impurezas e produtos secundários. O pH baixo do xarope é provavelmente resultante da formação de ácidos durante a transformação enzimática da sacarose em isomaltulose. Segundo Tate & Lyle (1981) e Cheetham et al. (1985), a conversão enzimática de sacarose em isomaltulose normalmente resulta na formação de alguns ácidos, mas na prática não foi necessário um controle rígido do mesmo, pois a enzima glicosiltransferase de *Erwinia raphontici* imobilizada é mais estável em pH entre 4,0 e 4,5, e a inclusão de tampões poderia interferir no processo de

cristalização da isomaltulose. Em alguns casos, a formação de ácidos pode ser reduzida utilizando-se concentrações altas de substrato.

A amostra deionizada apresentou uma resistividade de 300.000 ohm/cm, demonstrando uma baixa condutividade, sendo a mesma submetida a uma concentração até 70° Brix, resultando num volume de 400mL. Após o perfil de cristalização obteve-se um volume de 300 mL, o qual foi submetido a centrifugação. As Figuras 13 e 14 ilustram respectivamente as etapas de obtenção dos cristais por centrifugação e os cristais obtidos após secagem em estufa a vácuo.

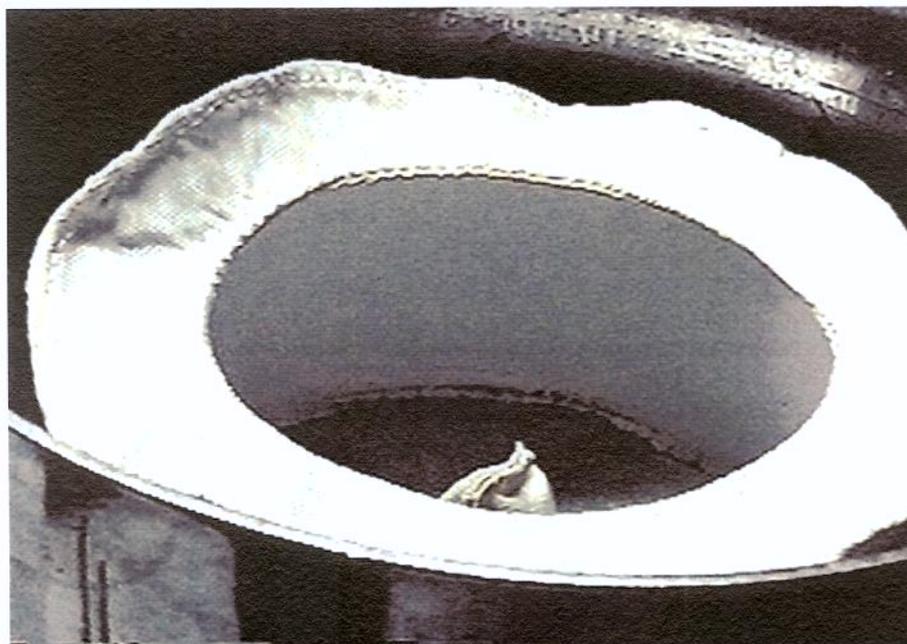


FIGURA 13 – Centrifugação dos cristais de isomaltulose.

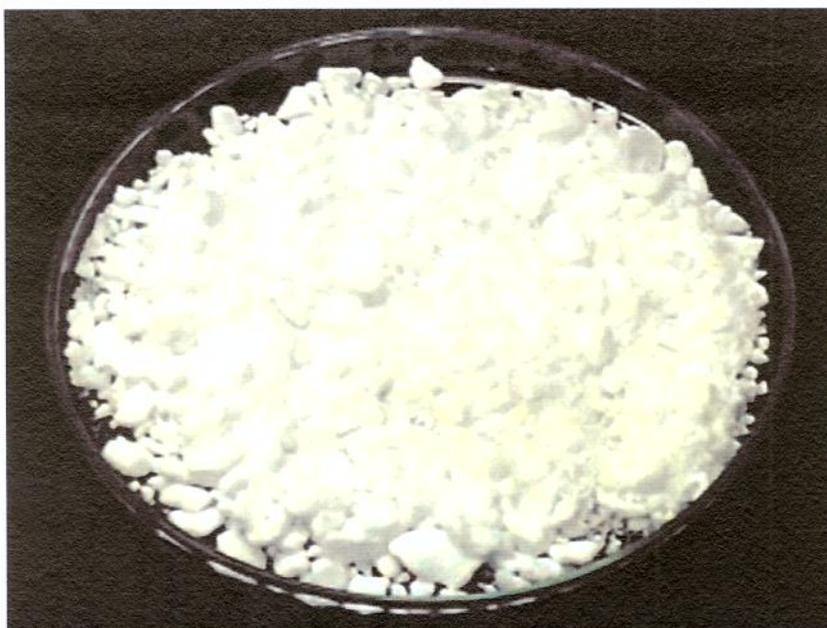


FIGURA 14 - Cristais de isomaltulose.

Os cristais recuperados por centrifugação e analisados por HPLC apresentaram 91,39% de isomaltulose (Tabela 17).

TABELA 17. Concentração de açúcares existentes no xarope obtido da transformação enzimática da sacarose e após o processo de purificação e cristalização.

	Porcentagem (%) de açúcares			
	Isomaltulose	Sacarose	Glicose	Frutose
Xarope obtido da transformação enzimática da sacarose.	19,99	24,17	0,64	0,57
Xarope deionizado	12,92	14,17	0,63	0,51
Água mãe (perfil 10°C)	32,50	65,00	0,70	0,97
Cristais obtidos após a purificação e cristalização	91,39	8,53	-----	0,08

Xyrofin Oy (2000a) submeteu a solução de isomaltulose obtida da coluna de *Protaminobacter rubrum* imobilizada a um processo de evaporação a 70-85°C até a uma concentração de 70% e, posteriormente, promoveram a cristalização por resfriamento linear de 65 a 25°C. Os cristais foram recuperados por centrifugação e analisados por HPLC. O autores obtiveram 95% de isomaltulose.

A solubilidade da isomaltulose é aproximadamente a metade da sacarose, o que facilita a sua separação na etapa de cristalização (Koga et al., 1985).

5. CONCLUSÕES.

1 - Dentre as linhagens *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp S390, *Klebsiella* sp K18 e 265-9 estudadas quanto a sua capacidade de produzir glicosiltransferase, a linhagem *Erwinia* sp D12 foi a que apresentou a maior atividade.

2 - As cepas mutantes de *Erwinia* sp D12, obtidas por radiação ultravioleta e metil-N-nitroso-guanidina de acordo com a metodologia empregada não apresentaram maior atividade de glicosiltransferase em relação a cepa parental.

3 - No estudo de otimização dos componentes melaço de cana e peptona do meio de cultura para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 foi obtido maior produção de enzima em meio de cultivo composto de melaço (12% de sólidos solúveis totais), peptona 4% e de extrato de carne 0,4%.

4 - A produção máxima de glicosiltransferase pela linhagem de *Erwinia* sp D12 foi obtida na fase exponencial de crescimento após 8 horas de fermentação do microrganismo em fermentador de 3L a 30°C, em meio de cultura contendo melaço (12% de sólidos solúveis totais), peptona 4% e de extrato de carne 0,4%. Foi obtido 13,89, 15,61 e 5,76 unidades de atividade/mL de meio de cultura após a fermentação do microrganismo a 28°C, 30°C e 32°C em fermentador New Brunswick de 3L.

5 - No estudo de otimização da conversão enzimática da sacarose em isomaltulose pelas células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, verificou-se que o rendimento de isomaltulose tende a aumentar com a diminuição da concentração de sacarose e com o aumento da temperatura. Foi obtido um rendimento de 56,38% de isomaltulose utilizando-se 19,4% de sacarose a 33,5°C, enquanto que com uma concentração de sacarose de 60% a 30°C, obteve-se um rendimento de 31,34% de isomaltulose.

6 - O rendimento de isomaltulose utilizando-se concentrações de sacarose em torno de 20-30% foi de 45 a 50%, sendo que nesta faixa experimental, quanto maior a concentração de substrato, maior o rendimento de isomaltulose.

6. SUGESTÕES PARA O PRÓXIMO TRABALHO.

1 - Otimização da produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 em meios de cultura contendo fontes alternativas de nitrogênio em substituição a peptona, visando diminuir o custo do processo.

2 - Estudo do consumo de carboidratos do meio de cultura contendo melaço de cana, durante a fermentação de *Erwinia* sp D12 visando a otimização da produção de glicosiltransferase.

3 - Otimização da imobilização de células de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, através do estudo da influência da concentração de células das esferas na conversão de sacarose em isomaltulose.

4 - Estudo da influência do tempo de armazenamento das células imobilizadas na atividade da glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12.

5 - Otimização da conversão de sacarose em isomaltulose, através do estudo da influência da vazão do substrato e tempo de incubação no rendimento de isomaltulose.

6 - Estudo de meia vida do leito catalítico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.5, p.319-367, 1987.

BANDO, M.H.; SATO, H.H. Estudo comparativo da produção e características bioquímicas das glicosiltransferases de *Erwinia* sp D12, *Klebsiella* sp S390 e *Klebsiella* sp K18 para conversão de sacarose em isomaltulose. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 1997, Campinas. **Progresso e ação para o ano 2001**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997. p. 85.

BIBBY, B. G.; FU, J. Changes in plaque pH in vitro by sweeteners. **Journal Dental Research**, Houston, v.64, n.9, p.1130-1133, 1985.

BOLLINGER, H. Future Ingredients - Focus of OVIFT Meeting. **Food Technology**, p. 60-64, Jan,1988.

BORNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.8, p.2425-2430, 2001.

CELESTINO, E.M. **Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose.** Campinas, 1998. 75 p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHANG, H. N.; SEONG, G. H.; YOO, I.K; PARK, J. K.; SEO, J. H. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p. 157-162, 1996.

CHEETHAM, P. S. J. The human sucrase-isomaltase complex: Physiological, biochemical, nutritional and medical aspects. In: LEE, C.K; LINDLEY, M.G. **Developments in food carbohydrate- 3. Disaccharidases.** London: Applied Science Publishers, 1982. p.107-140.

- CHEETHAM, P. S. J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemistry Journal**, v. 220, p. 213-220, 1984.
- CHEETHAM, P. S.J. Production of isomaltulose using immobilized microbial cells. **Methods in Enzymology**, v 136, p. 432-454, 1987.
- CHEETHAM, P. S. J.; BLUNT, K.W.; BUCKE, C. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p.2155-2168, 1979.
- CHEETHAM, P.S.J.; GARRETT,C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471 - 481, 1985.
- CHEETHAM, P.S.J.; IMBER, C.E.; ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v. 299, p. 628-631, 1982.
- COUGHLAN, M. P.; KIERSTAN, P. J. Preparation and applications of immobilized microorganisms: a survey of recent reports. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p.51-90, 1988.
- DAHLQVIST, A.; AURICCHIO, S.; SEMENZA, G.; PRADER, A. Human intestinal disaccharidases and hereditary disaccharide intolerance. The hydrolysis of sucrose, isomaltose, palatinose (isomaltulose), and 1,6- α - oligosaccharide (isomalto-oligosaccharide) preparation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.42, n.4, p.556-562, 1963.
- DAINTY, A. L.; GOULDING, K. H.; ROBINSON, P. K.; SIMPKINS, I.; TREVAN, M. D. Stability of alginate-immobilized algal cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n.2, p. 210-216, 1986.
- DERVAKOS, G.; WEBB, C. On the merits of viable-cell immobilization. **Biotechnology Advances**, v.9, p. 559-612, 1991.

DOMÍNGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.81, p. 119-130, 1999.

DORAN, P. M.; BAILEY, J. E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n.1, p. 73-87, 1986.

EGERER, P. Downstream processing of sucrose 6-glucosylmutase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v.36, n.3-4, p.65-77, 1994.

ERTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer degradation and stability**, v. 59, p.85-91, 1998.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FUJI, S.; KISHIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 30, n. 6, p. 339-344, 1983.

FUKUI, S.; TANAKA, A. Bioconversion of lipophilic or water insoluble compounds by immobilized biocatalysis in organic solvent systems. **Enzyme Engineering**, v. 6, p.191-200, 1982.

GBEWONYO, K.; WANG, D.I.C. Enhancing gas-liquid mass transfer rates in non-Newtonian fermentations by confining mycelial growth to microbeads in a bubble column. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p.2873-2888, 1983.

GODSHALL, M. A. How carbohydrates influence food flavor. **Food Technology**, v.51, n.1 p.63-67,1997.

GRILLO WERKE AG (ZINI), K. Bunthoff; F. Driemel; H. Nies; D. Rohed. **Preparation of copolymers for sequestering agents, etc.- from unsaturated carboxylic acid and alkaline solution of palatinose or leucrose using radical initiator.** D.E. n. PI 3834237-A, 7 Oct. 1988, 12 Apr. 1990.

HABETS-CRUTZEN, A. Q. H.; BRINK, L. E. S.; VAN GINKEL, C.G.; BONT, J. A. M.; TRAMPER, J. Production of epoxides from gaseous alkenes by resting-cell suspensions and immobilized cells of alkene-utilizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.245-250, 1984.

HASHIMOTO, H.; YAMADA, K.; YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl β -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v.9, n.12, p.849-854, 1987.

HERTEL, S.; HEINZ, F.; VOGEL, M. Hydrolysis of low-molecular-weight oligosaccharides and oligosaccharide alditols by pig intestinal sucrase/isomaltase and glucosidase/maltase. **Carbohydrate Research**, v.326, p.264-276, 2000.

HUANG, J.H.; HSU, L.H. & SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1998.

JAN, W.; HANS-JOACHIM, J. Kinetic model of disacchride oxidation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, p.12-16, 1995.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996a.

KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose, isomalt, and isomaltulose-based oligomers on mineral absorption and retention. **Biological Trace Element Research**, v.54, p.239-250, 1996b.

- KAWAI, K. ; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. **Endocrinology Japon**, v. 32, p. 933-936, 1985.
- KIERSTAN, M.; DARCY,G.; REILLY, J. Studies on the characteristics of alginate gels in relation to their use in separation and immobilization applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p. 1507-1517, 1982.
- KOGA, T.; MIZUTANI, T. Applications of palatinose for foods. **Proc. Res. Soc. Jap. Sugar Refineries Tech.**, v. 34, p. 45-57, 1985.
- KOPP, B.; REHM, H. J. Alkaloid production by immobilized mycelia of *Claviceps purpurea*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.18, n. 5, p.257-263, 1983.
- KUEK, C.; ARMITAGE, T. M. Scanning electron microscopic examination of calcium alginate beads immobilizing growing mycelia of *Aspergillus phoenicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, p. 121-125, 1985.
- LARGIER, S.T.; LONG, S.; SANTANGELO, J. D.; JONES, D.T.; WOODS, D.R. Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P262 mutants for solvent production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p.477-481, 1985.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi.2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 834p.
- LEITNER, C.; MAYR, P.; RIVA, S.; VOLC, J.; KULBE, K. D.; NIDETZKY, B.; HALTRICH, D. Enzymatic redox isomerization of 1,6-disaccharides by pyranose oxidase and NADH-dependent aldose reductase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 407-414, 2001.
- LICHTENTHALER, F.W. Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. **Carbohydrate Research**, v.313, p.69-89, 1998.

- LINA, B. A. R.; SMITS-VAN PROOIJJE, E; WAALKENS-BERENDSEN, D. H. Embryotoxicity/Teratogenicity study with isomaltulose (Palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.309-314,1997.
- LINGSTROM, P.; LUNDGREN, F.; BIRKHED, D.; TAKAZOE, I. & FROSTELL, G. Effects of frequent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. **European Journal of Oral Science**, v.105, p.162-169,1997.
- LOTTE COMPANY LIMITED, Yoshio Iijima; Ryohel Yamabe; Masahiro Nakatsukasa; Hiroko Ogiwara. **Sweetened condensed milk like composition and a method for producing it**. US. n. 4948616, 2 May. 1989, 14 Aug. 1990.
- LUND, B. M. ; WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotova* var.atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v. 78, p. 331-336,1973.
- LUONG, J. H. T.; TSENG, M. C. Process and technoeconomics of ethanol production by immobilized cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.4, p.207-216, 1984.
- MAHMOUD, W.; REHM, H. J. Morphological examination of immobilized *Streptomyces aureofaciens* during chlortetracycline fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3-4, p. 305-310, 1986.
- MAKI, Y.; OTHA, K.; TAKAZOE, I.; MATSUKUBO, Y.; TAKAESU, Y.; TOPITSOGLU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol and xylitol in suspension of human dental plaque. **Caries Research**, Basel, v.17, p.335-339, 1983.
- MALLETE, M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Eds). **Methods in Microbiology**. v. 1. London: Academic Press, 1969. p. 522-566.
- MARANCENBAUM, E.; PARK, Y. K. A mutant strain of isolated bacterium as potent producer of penicilium amidase. **Journal Fermentation Technology**, v.57, n. 2, p. 137-140, 1979

MATTIASSON, B.; HAHN-HAEGERDAL, B. Microenvironmental effects on metabolic behavior of immobilized cells. A hypothesis. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.1, p. 52-55, 1982.

McALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E.; FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v.12, n. 9, p. 667-672, 1990.

McDONALD, I.; DANIEL, J. W. The bio-availability of isomaltulose in man and rat. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v.28, n 5, p. 1083-1090, 1983.

MEITO SANGYO KABUSHIKI KAISHA, Susumu Higashi; Nobuo Kuriwa; Shinjiro Iwasaki. **Process for producing isomaltulose**. EP. n. 0392556 A1, 13 Apr. 1989, 17 Oct. 1990.

MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T.; NAKAJIMA, Y. & HAMADA, S. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. **Oral Microbiology Immunology**, Copenhagen, v.5, p.189-194, 1990.

MITSUI SUGAR CO., Ichiro Takazoe; Kosei Ohta; Junichi Shimizu; Kazumasa Susuki; Tatsuya Iwakura; Yoshikazu Nakajima. **Low cariogenic sweeteners**. US. n. PI 4.695.326, 03 Sept. 1985, 22 Sept. 1987.

MITSUI SUGAR CO.; SUEZUCKER AG, Toshiaki Sugitani; Kenichiro Tsuyuki; Yukie Miyata; Tadashi Ebashi; Hideaki Okui; Yoshikazu Nakajima; Kenzo Sawada. **Process for preparing trehalulose and isomaltulose**. EP. n. PI 0483755 A2, 29 Oct. 1991, 06 May. 1992.

MOHAMED, A. A.; REYAD, M. R.; AHMED, F.A. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p.1-9, 2000.

- MUGNIER, J.; JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.1, p.108-114, 1985.
- NAGAI, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K. Characterization of α -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.10, p.1789-1793, 1994.
- NAGAI-MIYATA, Y.; TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of a trehalose-producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 2049-2053, 1993.
- NAKAJIMA, H.; SOSNOMOTO, K.; MORIKAWA, H.; SATO, F.; ICHIMURA, K.; YAMADA, Y.; TANAKA, A. Entrapment of *Lavandula vera* cells with synthetic resin prepolymers and its applications to pigment production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 266-270, 1986.
- NAKAJIMA, H.; SOSNOMOTO, K.; USUI, N.; SATO, F.; YAMADA, Y.; TANAKA, A.; FUKUI, S. Entrapment of *Lavandula vera* cells and production of pigments by entrapped cells. **Journal of Biotechnology**, v.2, p. 107-117, 1985.
- NDIMDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C.; REMON, J.P. Characterization and evaluation of isomalt performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v.189, p. 113-124, 1999.
- NOLL-BORCHERS, M.; BUCHHOLZ, K. Kinetics and yields of 3-keto-isomaltulose by microbial oxidation of isomaltulose. **Biotechnology Letters**, v.15, n.2, p.139-144, 1993.
- OGBONNA, J. C.; YOSHIFUMI,.; NAKAMURA, K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v 67, n.2, p.92-96, 1989.
- OHTA, K. & TAKAZOE, I. Effect of isomaltulose on acid production and insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. **Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 24, p.1-11, 1983.

ONAKA, T.; NAKANISHI, K.; INOUE, T.; KUBO, S. Beer brewing with immobilized yeast. **Biotechnology**, v.3, p. 467-470, 1985.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with mutans streptococci. **Caries Research**, Basel, v.25, p.277-282, 1991.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; TAKEI, T.; FUJIWARA, T.; SOBUE, S. Plaque formation of dietary isomaltulose in humans. **Caries Research**, Basel, v.24, p.48-51, 1990.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 36, p. 219-223, 1983 a.

OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N.; HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. 43-49, 1983 b.

PARK, Y.K.; SANTI, S.S. Induction of high amyloglucosidase-producing mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal fermentation Technology**, v.55, n.2, p.193-195, 1977.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; HAUK, C. J.; KOCK, R.; LAMPERT, F.; LUTTICKEN, R.; HAASE, G. Assessmente of acid production by various human oral micro-organisms when palatinose or leucrose is utilized. **Journal of Dental Reserach**, v.80, n.1, p.378-384, 2001.

QURESHI, N.; PAI, J. S.; TAMHANE, D. V. Reactors for ethanol production using immobilized yeast cells. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.39, n.2, p.75-84, 1987.

ROBERTS, P.G.; HAYES, M.L. Effects of 2-deoxy D-glucose and other sugar analogues on acid production from sugars by human dental plaque bacteria. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Copenhagen, v.24, p. 201-209, 1980.

ROQUETTE FRERES, Pierrick Duflot; Catherine Fouache. **Method for producing palatinitol**. US. n. 6.204.378, 29 May. 1997, 20 Mar. 2001.

SASAKI, N.; TOPITSOGLOU, V.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E -49. **Swediser Dental Journal**, Stockholm, v.9, p.149-155, 1985.

SCHIWECK, H.; MUNIR, M.; RAPP, K. M.; SCHNEIDER, B.; VOGEL, M. New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. **Zuckerind**, v.115, n.7, p.555-565, 1990.

SCOTT, R. I.; WILLIS, S. J.; BUCKE, C. Oxygen uptake by carrageenan entrapped *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 10, p.58-61, 1988.

SHARPE, E. S.; STODOLA, F.H.; KOEPEL, H. J. Formation of isomaltulose in Enzymatic Dextran synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.1062-1063, 1960.

SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA, Akio Hitoshio; Hisao Takamatsuo; Reiko Hattori. **Process for production of isomaltulose**. EP. n. 0301522 A2, 27 Sept. 1988, 01 Feb. 1989.

SMITH, M. R.; ZAHNLEY, J ;GOODMAN, N. Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 1355. **Applied and Environmental Microbiology**, v 12, p. 2723-2731, 1994.

SOMOGYI-NELSON, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SUDDEUTSCHE ZUCKER-AKTIENGESELLSCHAFT, Mohammad Munir. **Production of isomaltulose using immobilized microorganisms**. US. n. 4.640.894, 30 Oct. 1985, 03 Feb. 1987.

SUDDEUTSCHE ZUCKER, Scheweck, H.; Steinle, G.; Harbel, L. **Processo para obtenção de isomaltita**. Br. n. PI 22.17628.9, 12 abr. 1973, 27 jun. 1974.

SUEDZUCKER AG MANNHEIM/OCHSENFURT, HAARMANN & REIMER CORP, COIA KA, MILES LAB INC, K.A Coia; M. J. Lynch. **Hard, slow-dissolving lozenge of hydrogenated isomaltulose-contains anti-tussive, descongellant, anti-histamine or expectorant agent.** EP n. 431376-A, 17 Nov. 1990, 12 June. 1991.

SUEDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT, Joachim Klein; Wolfgang Behrens; Markwart Kunz. **Isomaltamine and acylated, methods for preparation and their use.** EP. n. 255033B1, 22 July. 1987, 06 Apr. 1994.

SUEDZUCKER MANNHEIM/OCHSENFURT (BOEF), F. W. Lichtenthaler; D. Martin; H. M. Schiweck; T.A. Webwer; F.W. Lichtentha; T. Weber; H. Schiweck. **Treating isomaltulose in polar aprotic solvent with ion-exchange resin to form 5-(alpha-D-glucopyranosyl-oxymethyl)-furan-2carboxaldehyde used to produce new derivs. By modifying aldehyde gp.** DE. n. 3936522-A, 02 Nov. 1989, 08 May. 1991.

TAKAZOE, I. New trends on sweeteners in Japan. **International Dental Journal.**, v.35, p.58-65, 1985.

TAKAZOE, I. Palatinose- an isomeric alternative to sucrose. In: GRENBY, T.H. (Ed.). **Progress in sweeteners.** Barking: Elsevier Applied Food Science series, 1989, p.143-167.

TATE & LYLE, Christopher Bucke; Peter Samuel James Cheetham. **Production of isomaltulose.** UK n. 2063268A, 7 Nov. 1979, 3 June. 1981.

TATE & LYLE, Christopher Bucke; Peter Samuel James Cheetham. **Method of reducing dental plaque formation with products for human or animal consumption using isomaltulose sucrose substitute.** US. n.4587119, 14 Dec. 1984, 6 May. 1986.

TOPITSOGLU, V.; SASAKI, N.; TAKAZOE.I.; FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, Basel, v.18, p.14-51, 1984.

TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; MIYATA, Y.; EBASHI, T. & NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of isomaltulose and trehalulose production bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v.38, p.483-490, 1992.

UEKANE, R.T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp e produção de isomaltulose a partir de sacarose.** Campinas, 1993. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 63 p.

VERONESE, T.; PERLOT, P. Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. **FEBS Letters**, v. 441, p.348-352, 1998.

VIEIRA, A. M.; SA-CORREIA, I.; NOVAIS, J. M.; CABRAL, J.M.S. Could the improvements in the alcoholic fermentation of high glucose concentrations by yeast immobilization be explained by media supplementation? **Biotechnology Letters**, v.11, n.2, p.137-140, 1989.

VISSOTO, F. Z.; LUCCAS, V. Aplicação de isomalte em drageados, chocolates, balas e pastilhas. In: Seminário: **Produtos Diet e Light**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2000. 153 p.

WATANABE, M.; MATSUMURA, M.; YABUKI, S.; AIZAWA, M.; ARAI, S. Construction of a bioreactor with immobilized yeast cells for production of a low-phenylalanine peptide mixture as a phenylketonuria foodstuff. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n.12, p. 2989-2994, 1988.

XYROFIN OY, Marja-Leena Sarkki; Heikki Heikkila; Tapio Viljava. **Processos para a isomerização de sacarose em isomaltulose para a produção de isomalte a partir de sacarose, e, veículo adaptado para uso em um processo microbiano para a isomerização de sacarose em isomaltulose.** BR. n. PI 9709100-6A, 16 maio. 1987, 11 jan. 2000a.

XYROFIN OY, Heikki Heikkila; Marja-Leena Sarkki; Mirja Lindroos; Paivi Ojala; Vili Ravanko; Matti Tylli. **Process for the production of isomaltulose and others products.** US. n. 6.146.856, 21 May. 1998, 14 Nov. 2000b.

ZIESENITZ, C. S.; SIBERT, G. The metabolism and utilization of polyols and other bulk sweeteners compared with sugar. In: GERBY, T. H. (Ed.). **Developments in sweeteners** 3. London: Elsevier Applied Science, 1987. p. 109-149.

8. ANEXO.

ANEXO 1. “Ridge analysis” do máximo rendimento de isomaltulose durante a conversão enzimática da sacarose em isomaltulose, utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12.

Código	Resposta estimada (%)	Erro padrão	Temperatura (° C)	Sacarose (%)
0.0	40.06	2.56	30.00	36.25
0.1	41.19	2.55	30.23	34.15
0.2	42.38	2.50	30.56	32.31
0.3	43.65	2.44	30.95	30.74
0.4	45.04	2.37	31.38	29.37
0.5	46.56	2.32	31.83	28.16
0.6	48.22	2.33	32.29	27.05
0.7	50.07	2.43	32.75	26.01
0.8	51.98	2.66	33.23	25.03
0.9	54.09	3.02	33.70	24.09
1.0	56.35	3.53	34.17	23.18

