

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

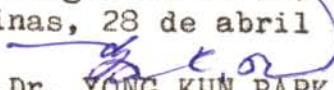
**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
 β -FRUTOFURANOSIDASE DE *Aureobasidium sp* E SUA
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

ILA MARIA DE AGUIAR OLIVEIRA
Farmacêutico - Bioquímica

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

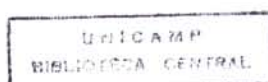
PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defen-
dida por ILA MARIA DE AGUIAR
OLIVEIRA e aprovada pela Co-
missão Julgadora em 28.04.97.
Campinas, 28 de abril 1997


Prof. Dr. YONG KUN PARK
Presidente da Banca

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

04/97



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	71 UNICAMP
	OL4p
V.	Ex.
NUMERO BC	30840
PREC.	28497
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/06/97
N.º CPD	

CM-00098242-1

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

OL4p

Oliveira, Ila Maria de Aguiar

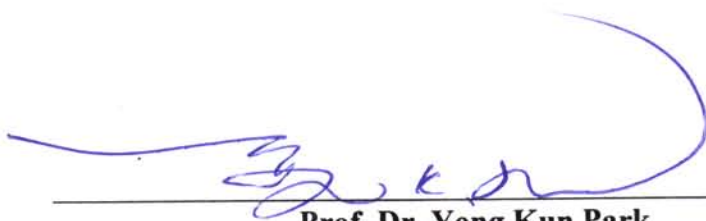
Produção e caracterização da β -frutofuranosidase de
Aureobasidium sp e sua aplicação na produção de frutooligossarídeos
/ Ila Maria de Aguiar Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n], 1997.

Orientador: Yong Kun Park

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Frutooligossacarídeos. 2. β -frutofuranosidase
3. *Aureobasidium sp*. I. Park, Yong Kun II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador



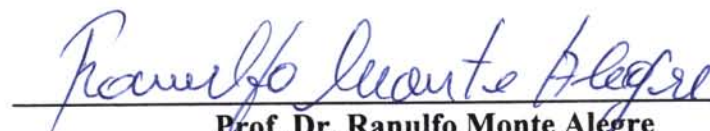
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
Membro



Profa. Dra. Elba Bon
Membro



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Membro



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Membro

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Membro

Campinas, 28 de abril de 1997.

À minha família pelo apoio e estímulo
permanente durante a minha formação profissional

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orientação competente, atenção e apoio prestados na realização deste trabalho.

À Universidade do Amazonas, que possibilitou a nossa participação no Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Ao PICDT-CAPES, pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela atenciosa revisão da tese e valiosas sugestões apresentadas.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore, pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Masaharu Ikegaki e Dong Yim, pela prestimosa colaboração durante a fase experimental.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela convivência e amizade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. CARACTERÍSTICA, ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE	7
2.2. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	22
2.2.1. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL	22
2.2.2. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR SÍNTESE ENZIMÁTICA	26
2.2.3. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	32
2.2.4. HIDRÓLISE DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	34
2.3. SUPLEMENTAÇÃO DE FATORES BIFIDOGÊNICOS NA DIETA.....	39
2.4. EFEITOS BENÉFICOS DA INGESTÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	42
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. MATERIAIS.....	46
3.1.1. EQUIPAMENTOS.....	46
3.1.2. REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS.....	47
3.2. MÉTODOS:.....	48
3.2.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS OSMOFÍLICOS DE AMOSTRAS DE VEGETAIS, SOLO E MEL.....	48
3.2.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β -FRUTOFURANOSIDASE.....	49
3.2.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE β -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA	49
3.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE.....	50
3.2.5. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES	51

3.2.5.1. CROMATOGRAFIA EM PAPEL	51
3.2.5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	52
3.2.6. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO DO <i>Aureobasidium sp</i> 771-1, PRODUÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO	52
3.2.7. PREPARAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA A PARTIR DO <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	53
3.2.8. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	54
3.2.8.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA.....	54
3.2.8.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA.....	55
3.2.8.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA.....	55
3.2.8.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA.....	56
3.2.9. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	56
3.2.9.1. PREPARAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR	56
3.2.9.2. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-SEPHAROSE CL-6B	57
3.2.9.3. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CM-SEPHAROSE CL-6B.....	58
3.2.9.4. OBTENÇÃO DA ENZIMA PURIFICADA.....	58
3.2.10. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE	

<i>Aureobasidium</i> sp 771-1	59
3.2.10.1. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium</i> sp 771-1.....	59
3.2.10.2. DETERMINAÇÃO DO pH DE ESTABILIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium</i> sp 771-1	60
3.2.10.3. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium</i> sp SP 771-1	60
3.2.10.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ESTABILIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium</i> sp 771-1	61
3.2.10.5. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium</i> sp. 771-1.....	61
3.2.10.6. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE PURIFICADA	62
3.2.10.7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: K_m E V_{max}	62
3.2.11. APLICAÇÃO DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS	64
4.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β-FRUTOFURANOSIDASE.....	64
4.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA LINHAGEM N.º 771-1 PRODUTORA DE β-FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA	68
4.4. RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO CELULAR DO <i>Aureobasidium</i> SP 771-1,	

PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASE E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	74
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	76
4.5.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	76
4.5.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	77
4.5.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	78
4.5.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	79
4.6. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	80
4.7. CARACTERIZAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	84
4.7.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	84
4.7.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	86
4.7.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	87
4.7.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp 771-1</i>	89

4.7.5. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	91
4.7.6. EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS E INIBIDORES NA ATIVIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	93
4.7.7. DETERMINAÇÃO DO VALORES DE K _M E V _{MAX} DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	97
4.4.8. APLICAÇÃO DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS	100
5. CONCLUSÕES	105
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Transformação da sacarose a frutooligossacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular e intracelular de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	67
Figura 2: Cultivo de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 em meio YM a 25°C	69
Figura 3: Cultivo de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 em meio agar sacarose a 25°C	70
Figura 4: Cultivo de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 em meio PDA a 25°C.....	71
Figura 5: Características morfológicas do <i>Aureobasidium sp</i> 771-1, cultivado em meio YM - 3 dias de incubação (450 X).....	72
Figura 6: Características morfológicas do <i>Aureobasidium sp</i> 771-1, cultivado em meio YM - 5 dias de incubação (1000 X).....	72
Figura 7: Características morfológicas do <i>Aureobasidium sp</i> 771-1, cultivado em meio YM - 10 dias de incubação (1000 X).....	73
Figura 8: Características morfológicas da linhagem de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 após cultivo em meio líquido constituído de 10% sacarose, 0,5% extrato de levedura e 0,1% uréia.....	73
Fig. 9: Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento celular e produção da β -frutofuranosidase de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	75
Figura 10: Efeito do pH na atividade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	77
Figura 11: Efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	78
Figura 12: Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	79

Figura 13: Efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	80
Figura 14: Fluxograma de produção e purificação da β -frutofuranosidase extracelular de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1.....	81
Figura 15: Cromatografia da β -Frutofuranosidase Extracelular de <i>Aureobasidium sp.</i> 771-1 em Coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.....	82
Fig. 16: Cromatografia da β -Frutofuranosidase Extracelular de <i>Aureobasidium sp.</i> 771-1 em coluna de CM-Sepharose CL-6B	82
Figura 17: Efeito do pH na atividade enzimática da β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	85
Figura 18: Efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	86
Figura 19: Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	88
Figura 20: Efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	91
Figura 21: Relação entre o volume de eluição e o peso molecular das proteínas na coluna Sephadex G-200	92
Figura 22: Determinação do K_m e V_{max} de β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1	99
Fig. 23a: Conversão da sacarose a frutooligossacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp</i> 771-1 (30% de sacarose).....	103
Fig. 23b: Conversão da sacarose a frutooligossacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium sp.</i> 771-1 (50% de sacarose).....	103

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Transformação de sacarose a outros açúcares pelos microrganismos isolados</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 2 - Produção da enzima β-frutofuranosidase a partir dos microrganismos isolados</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 3 - Atividade de transferência e de hidrólise das β-frutofuranosidases extracelulares de microrganismos isolados</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 4 - Purificação da β-frutofuranosidase de <i>Aureobasidium</i> sp. 771-1..</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 5 - Efeito de íons metálicos na atividade da β-frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium</i> sp.771-1.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 6 - Efeito de inibidores na atividade da β-frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium</i> sp. 771-1.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 7 - Conversão de sacarose a frutooligossacarídeos através da β-frutofuranosidase extracelular purificada de <i>Aureobasidium</i> sp 771-1... </i>	<i>101</i>

RESUMO

Frutooligossacarídeos são açúcares produzidos a partir da sacarose pela ação da β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) e consistem, principalmente, de 1-kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil nistose (GF_4), em que uma a três unidades de frutose são unidas através de ligações glicosídicas β -2,1 a unidades de frutose da sacarose, respectivamente. Os frutooligossacarídeos produzidos pela ação de enzimas microbianas têm-se destacado devido a seus efeitos fisiológicos específicos em seres humanos e suas excelentes vantagens funcionais em alimentos.

O objetivo deste trabalho foi isolar uma linhagem microbiana que possua β -frutofuranosidase com alta atividade, para produzir frutooligossacarídeos e estudar as características bioquímicas dessa enzima.

Foram isoladas 1752 linhagens de microrganismos, provenientes de pólen de flores, mel, solo, folhas e caule de vegetais coletados em diversas regiões do Brasil. Essas linhagens eram, principalmente, leveduras osmofílicas produtoras de enzimas que transformam a sacarose em outros açúcares, de interesse industrial. Dentre os 1752 microrganismos isolados, 52 linhagens apresentaram β -frutofuranosidase com atividade de transferência, convertendo sacarose a frutooligossacarídeos: 1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose, mas, somente 8 produziram β -frutofuranosidase extracelular e intracelularmente, destacando-se a linhagem de *Aureobasidium* sp. 771-1 que produziu altos teores de β -frutofuranosidase extracelular, com atividade de transferência de grupos frutose, sendo, portanto, selecionada para ser estudada, nesse experimento, quanto as suas características enzimáticas.

A β -frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp 771-1 foi purificada 29,5 vezes (12% de rendimento), em relação à enzima bruta e mostrou atividade específica de 266 unidades/mg de proteína. A enzima apresentou pH e temperatura ótimas de 5,5 e 55°C, respectivamente, mostrando-se estável na faixa de pH 4,5 a 6,0 em

temperaturas inferiores a 55°C, sendo inibida pelos íons Hg^+ e I_2 e, também, pelos reagentes bromosuccinimida e p-hidroximercuribenzoato, nas concentrações de 1 e 10 mM, após 30 minutos de incubação a 55°C. Quanto aos parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} , a β -frutofuranosidase apresentou os valores de 0,36 M e 6,3 $\mu\text{mol/ml/min.}$, respectivamente, para o substrato sacarose. Seu peso molecular foi estimado em 200.000 daltons, através de filtração em gel Sephadex G-200.

A β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1 converteu 61% da sacarose (50% p/v) para frutooligossacarídeos, sendo obtidos 38% de 1-kestose, 20% de nistose e 3% de frutofuranosil nistose.

SUMMARY

Fructooligosaccharides are produced from sucrose by the action of β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) and consist mainly of 1-kestose, nistose and fructofuranosyl nistose, in which one, two or three fructosyl units are bound at the β -2,1 position of sucrose, respectively. Fructooligosaccharides from sucrose have become important because of their specific physiological effects on humans and their excellent functional advantages in food.

The objective of this work was to isolate a strain of microorganisms which produced high β -fructofuranosidase activity for the production of fructooligosaccharides and to study the characteristics of the enzyme.

One thousand seven hundred and fifty two strains of microorganism were isolated from pollens, honey, soil, leaves, flowers and stalks of plants from several regions in Brazil. They were mainly osmophilic yeasts producing enzymes which transformed sucrose to other sugars that have attracted industrial interest.

Among these 1752 strains, 52 strains showed high activity of β -fructofuranosidase which converted sucrose to fructooligosaccharides such as 1-kestose, nystose and fructofuranosyl nystose, but only 8 produced both extra and intracellular β -fructofuranosidase. The strain of *Aureobasidium* sp 771-1 was found to produce the most extracellular β -fructofuranosidase with greater activity of fructosyl transfer for fructooligosaccharide production. This enzyme was selected to be purified and characterized.

The extracellular β -fructofuranosidase was purified about 29.5-fold (12% yield) with respect to the crude enzyme preparation with a specific activity of 266 units/mg protein. It was found that the optimum pH and temperature for activity were 5.5 and 55°C, respectively. The enzyme was stable from pH 4.6 to 6.0 and at temperatures below 55°C. The activity of the enzyme was inhibited by Hg^+ and I_2 . The enzyme was also inactivated by N-bromosuccinimide and p-

hydroxymercuribenzoate at 1 mM and 10 mM, after 30 minutes at 55°C. The K_m and V_{max} values of β -fructofuranosidase for sucrose were 0.36 M and 6.3 $\mu\text{mol/ml/min.}$, respectively. The molecular weight of the enzyme was determined to be 200.000 daltons by Sephadex G-200 gel filtration.

The β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp* 771-1 formed 61% of fructooligosaccharides, which consisted of 38% 1-kestose, 20% nystose and 3% fructofuranosyl nystose, when 50% sucrose was used as substrate.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o aparecimento de novos açúcares, tais como: palatinose (CHEETHAM *et alii*, 1985 e YUN *et alii*, 1992b), ciclodextrinas (PSZCZOLA, 1988), isomaltoligossacarídeos (KOHMOTO *et alii*, 1991 e YUN *et alii*, 1994b), galactooligossacarídeos (ONISHI *et alii*, 1995) e frutooligossacarídeos (JUNG *et alii*, 1987 e 1989; YUN *et alii*, 1992a, 1993, 1994a e 1995), têm tido um impacto significativo na indústria de açúcares, devido as suas excelentes vantagens funcionais em alimentos além de seus aspectos fisiológicos e físicos (OKU *et alii*, 1984; MCKELLAR & MODLER, 1989; SPIEGEL, 1994).

Em particular, os frutooligossacarídeos, obtidos através da conversão enzimática da sacarose, têm-se destacado. Sua importância industrial vem aumentando devido a sua produção ser relativamente simples, seu sabor ser semelhante à sacarose e possuir características fisiológicas específicas na prevenção da cárie dental, redução nos níveis séricos de colesterol total e lipídios e como estimulante do crescimento de bifidobactérias no trato digestivo (YAMASHITA *et alii*, 1984; HIDAKA *et alii*, 1986 e 1988; MODLER *et alii*, 1990b; MODLER, 1994). Tais aspectos se tornam ainda mais relevantes, se considerarmos que o Brasil é o maior produtor mundial de sacarose.

Frutooligossacarídeos são oligômeros de $1^F\text{-(1-}\beta\text{-frutofuranosil)}_{n-1}$ sacarose, cujo n pode variar de 2 a 4: n=2, 1-kestose (GF₂); n=3, nistose (GF₃); n=4 $1^F\text{-}\beta\text{-frutofuranosil nistose (GF}_4\text{)}$ (OKU *et alii*, 1984).

Os frutooligossacarídeos são produzidos a partir da sacarose, através da transfrutossilação, catalisada pela β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosideo frutohidrolase: EC 3.2.1.26) ou β -frutossiltransferase (β -D-frutofuranosideo frutossiltransferase: EC 2.4.1.9) de microrganismos e plantas (CHANG *et alii*, 1994).

As β -frutofuranosidases catalisam a transferência de grupos frutossil da sacarose a outros aceptores e, também, possuem atividade de hidrólise, quando a água é o aceptor preferencial. A especificidade do aceptor para a transfrutossilção, as estruturas dos produtos transfrutossilados, bem como a proporção da transfrutossilção, na catálise total, dependem da fonte da enzima e das condições da reação (CHEETHAM *et alii*, 1989; FUJITA *et alii*, 1990a,b e 1994).

Os frutooligossacarídeos, disponíveis comercialmente, consistem de 1-kestose, nistose e 1F- β -frutofuranosil nistose que são produzidos pela transferência de uma a três moléculas de frutose, respectivamente, ligadas à posição β -2,1 da sacarose pela ação da β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* (HIDAKA *et alii*, 1988) e *Aureobasidium pullulans* (JUNG *et alii*, 1989; HAYASHI *et alii*, 1991c). A atividade desta enzima é fortemente inibida pela glicose que é gerada como subproduto; conseqüentemente, a maioria dos frutooligossacarídeos, produzidos industrialmente, contém sacarose, glicose e frutose, cujo teor máximo de frutooligossacarídeos é de 55-60% em base seca.

Recentemente, Meiji Seika Kaisha Ltda, do Japão, vem produzindo frutooligossacarídeos com alto teor de kestose e nistose, através do processo de separação em colunas de troca iônica (YUN *et alii*, 1990, 1994a; MODELER *et alii*, 1990b).

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

Os frutooligossacarídeos que representam de 20 a 40% do poder edulcorante da sacarose, são de baixo valor calórico, não cariogênicos, estimulantes da flora microbiana intestinal, não digeríveis no intestino delgado, sendo seletivamente utilizados pelas bactérias do colon, e especialmente,

bifidobactérias que hidrolisam estes açúcares. Estudos recentes indicam que os frutooligossacarídeos têm efeito favorável no metabolismo de carboidratos e lipídios, semelhante às fibras na dieta. Outros benefícios associados com a ingestão de frutooligossacarídeos na microflora intestinal, são: a diminuição do pH intestinal, restrição no crescimento de bactérias patógenas e putrefativas, redução da constipação intestinal e decréscimo nos níveis de triglicerídeos e colesterol do soro sanguíneo (OKU *et alii*, 1984; HIDAKA *et alii*, 1986; MODLER *et alii*, 1990b; MURAMATSU *et alii*, 1992, 1993; CARLSSON *et alii*, 1992; SPIEGEL *et alii*, 1994; MODLER, 1994).

Estudos "in vivo" e "in vitro" em ratos, demonstram que os frutooligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas digestivas da mucosa intestinal e pâncreas. Quando injetados por via endovenosa, são rapidamente excretados na urina sem degradação, indicando, portanto, nenhuma decomposição pelas enzimas hidrolíticas de órgãos internos. Ratos, quando alimentados com uma dieta contendo frutooligossacarídeos, por um período prolongado, apresentam um aumento significativo no bolo fecal e na excreção de ácidos graxos voláteis, bem como uma redução no trânsito gastrintestinal e nos níveis de triacilgliceróis (OKU *et alii*, 1984; TOKUNAGA *et alii*, 1986 e 1989; SPIEGEL *et alii*, 1994).

Os frutooligossacarídeos são, frequentemente, encontrados numa grande variedade de vegetais comestíveis, sendo utilizados como fonte de alimentação animal e humana, incluindo-se como exemplos: banana, cevada, alho, mel, cebola, centeio, açúcar mascavo, tomate, aspargos, tubérculos, trigo e triticales (BACON & EDELMAN, 1951; EDELMAN & BACON, 1951; HENDERSON *et alii*, 1959; SAUNDERS & WALKER, 1969; SHIOMI *et alii*, 1976 e 1979; HENRY & DARBYSHIRE, 1980; FISHBEIN *et alii*, 1988; LEE *et alii*, 1992; SPIEGEL *et alii*, 1994).

Estes açúcares, também denominados de "neosugars", são produzidos a partir da sacarose, através da transferência de radicais frutosila à sacarose pela ação de β -frutofuranosidases microbianas obtidas de *Aspergillus oryzae* (PAZUR,

1952; CHANG *et alii*, 1994), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1980; NISHIZAWA *et alii*, 1980), *Aureobasidium pullulans* (JUNG *et alii*, 1987; HAYASHI *et alii*, 1989 e LEE *et alii*, 1992), *Aspergillus niger* (HIDAKA *et alii*, 1988; PARK & ALMEIDA, 1991), *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et alii*, 1992b,c; DUAN *et alii*, 1993; CHEN, 1996), *Candida sp.* (PARK *et alii*, 1993), *Aspergillus sydowi* (MURAMATSU *et alii*, 1988), *Penicillium oxalicum* (YASUDA *et alii*, 1986), *Arthrobacter sp* (FUJITA *et alii*, 1990a,b).

Recentemente a produção de alimentos funcionais, ou seja, alimentos que têm uma função fisiológica ou bio-moduladora, além de suas propriedades nutricionais e sensoriais (ARAI, 1996; CHILDS, 1994), vem sendo uma preocupação de países como o Japão, os E.U.A. e, também, da comunidade européia, pois atuam na prevenção de patologias e, portanto, na promoção do bem-estar do indivíduo.

Os frutooligossacarídeos pertencem a essa categoria de alimentos funcionais, pois estimulam o aumento da população de bifidobactérias do cólon, que é numérica e fisiologicamente o gênero de bactérias mais importante da microflora intestinal, com consequente supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas existentes no intestino grosso, restringindo, portanto, a formação de toxinas e outras substâncias nocivas ao ser humano. Outros efeitos relacionados à ação das bifidobactérias incluem a produção de vitaminas do complexo B, redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos, além de atuarem como imunomoduladores (GIBSON *et alii*, 1994; GIBSON & WANG, 1994a).

O controle da flora intestinal poderá ser exercido através da ingestão de fatores bifidogênicos, mais especificamente de frutooligossacarídeos, ou através do consumo de bifidobactérias vivas, porém, a incorporação de bifidobactérias em alguns alimentos, particularmente em produtos lácteos fermentados, apresenta desvantagens, tais como: baixa tolerância das bifidobactérias a alimentos ácidos, redução do número viável de bifidobactérias, devido às condições ácidas da secreção gástrica e bile, tendência das bactérias naturais da microflora intestinal eliminarem espontaneamente espécies exógenas, além da competição por sítios de

adesão e substratos. Portanto, as espécies de bifidobactérias, para serem consideradas culturas viáveis como adjuntos em alimentos, devem ser habitantes naturais do trato intestinal. (HOOVER, 1993; ISHIBASHI & SHIMAMURA, 1993)

A administração de frutooligossacarídeos, ao contrário da ingestão de microrganismos vivos, apresenta a vantagem de não serem hidrolisados pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal e sobretudo de estimular o crescimento das bifidobactérias nativas do intestino humano, que por conseguinte, inibem o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* e *E. coli* (MODLER, 1994; GIBSON *et alii*, 1994). Estes fatos sugerem que uma dieta suplementada com fatores bifidogênicos deve ser implementada, porém, evidências definitivas da eficácia desses compostos são necessárias, visto que estudos “in vivo” e “in vitro” são variáveis. Verifica-se que há interesse industrial na produção e aplicação de fatores bifidogênicos, contudo, em alguns casos, o marketing tem se sobreposto à pesquisa. Há, portanto, a necessidade de pesquisa básica e aplicada para que se atinja uma credibilidade maior com relação a esses produtos.

O estudo de alimentos funcionais é uma área emergente para inúmeras pesquisas e com grande potencial mercadológico. Segundo estimativas conservadoras sobre o mercado de alimentos funcionais no Japão, este atingiria 5% do total dos alimentos consumidos ou seja US\$ 5 bilhões (PITT, 1994). Com relação ao mercado internacional, GHERTY (citado por PITT, 1994) estima um crescimento de US\$ 8 bilhões para US\$ 500 bilhões, para o ano de 2010.

O objetivo deste trabalho é isolar uma linhagem microbiana produtora de β -frutofuranosidase, que possua maior atividade de transferência de grupos frutosila que de hidrólise, estudar suas características enzimáticas e, também, a produção de frutooligossacarídeos, a partir da sacarose, visando futura utilização industrial.

Os objetivos específicos visam selecionar um microrganismo osmofílico produtor de β -frutofuranosidase com alta atividade de transfrutossilção,

identificar o microrganismo isolado, purificar a β -frutofuranosidase, estudar o efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade da β -frutofuranosidase bruta e purificada, determinar o peso molecular e os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da enzima purificada, estudar a influência de íons metálicos e inibidores, na atividade enzimática, e o efeito da concentração de sacarose, na produção de frutooligossacarídeos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICA, ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE

Preparações enzimáticas de leveduras, fungos e plantas demonstraram possuir atividade de transferência de carboidratos, sintetizando oligo e heterossacarídeos, através da transferência de resíduos de frutose da sacarose para aceptores específicos (BACON & EDELMAN, 1950; BLANCHARD & ALBON, 1950).

ARONOFF & BACON (1952) constataram que uma única enzima era responsável por ambas as atividades de transferência e de hidrólise.

BACON & EDELMAN (1950) e BLANCHARD & ALBON (1950) observaram a formação de novos tri e tetrassacarídeos durante a ação da invertase de leveduras na sacarose.

BACON & EDELMAN (1950) verificaram a presença de três oligossacarídeos que foram denominados I, II e III em ordem decrescente de seus R_f . Esta nomenclatura também foi aceita por WHITE & SECOR (1952) e BACON (1954).

ALBON *et alii* (1953) obtiveram o trissacarídeo kestose, um dos oligossacarídeos sintetizados durante a ação da invertase de levedura em soluções concentradas de sacarose, sendo composto de dois radicais de D-frutose e um de D-glicose. Análises feitas nos produtos da clivagem do açúcar metilado mostraram que sua estrutura era um O- α -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)O- β -D-frutofuranosil(6 $\rightarrow$ 2) β -D-frutofuranosídeo. A nomenclatura desses novos compostos sempre apresentou problemas. O primeiro da série denominado $G_1 \alpha$ - β -2 Fruf 6— β 2-Fruf(II), foi chamado de kestose. O composto $G_1 \alpha$ — β 2-Fruf 1— β 2-Fruf (III), não possuía nenhuma denominação. O nome kestose, assim

estabelecido, apresentou alguma controvérsia. Na tentativa de solucionar esse impasse, GROSS *et alii* (1954) sugeriram que a substância (II), também conhecida como kestose, fosse denominada de 6-kestose; a substância caracterizada como (III), fosse a 1-kestose e a substância (I), um trissacarídeo não redutor, cuja estrutura é um O- β -D-frutofuranosil(2 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) β -D-frutofuranosídeo, fosse denominado de neokestose.

EDELMAN (1954) relatou que esses oligossacarídeos, com exceção do componente I, possuíam maior proporção de frutose em relação à glicose do que o substrato original, havendo, portanto, forte evidência de que o componente I tenha sido produzido pela transferência de frutose para a glicose da molécula de sacarose.

Segundo HESTRIN (1940), a β -frutofuranosidase de fungo era semelhante à da levedura, bem como os oligossacarídeos produzidos por ambos.

Oligossacarídeos similares também foram produzidos a partir da sacarose e inulina, através do extrato enzimático de tubérculos de alcachofra. Após diálise e centrifugação desse extrato, foram obtidas duas frações com atividade enzimática: uma contendo enzima de transferência similar a transfrutosidase e a outra, atividade de hidrólise, provavelmente invertase (EDELMAN & BACON, 1951).

PAZUR (1952) isolou de culturas de *Aspergillus oryzae*, uma enzima de transferência de carboidratos: transfrutosidase. A ação dessa enzima diferia daquela transfrutosidase de extrato de alcachofra caracterizada por EDELMAN & BACON (1951). A principal diferença era quanto à especificidade do substrato. Sacarose e rafinose atuavam como substratos para a enzima do *A. oryzae*, mas, não para a enzima da alcachofra. Por outro lado, a inulina funcionava como substrato para a transfrutosidase de alcachofra, mas, não para a de *A. oryzae*. Diferenças menores existiram em relação ao requerimento de co-substratos para as duas enzimas, como por exemplo: melezitose para transfrutosidase de alcachofra e inulobiosil-D-glucose para transfrutosidase de *A. oryzae*. O modo de ação da transfrutosidase foi representada por duas etapas: na primeira, o

mecanismo envolvia a colisão da enzima com as moléculas de substrato, formando um complexo frutossil-enzima (FR.E.), relativamente estável com liberação tanto de glicose ou melibiose. A segunda etapa envolvia a aproximação do complexo frutossil-enzima com a molécula do co-substrato e a transferência de unidades de frutose ao co-substrato com a dissociação de novos oligossacarídeos do complexo. Portanto, o mecanismo de ação da transfrutosidase consistia na transferência de unidades frutossil, da sacarose ou rafinose, para compostos frutossil (frutose, sacarose, 1-inulobiosil-D-glucose ou rafinose), funcionando como co-substratos para a enzima.

SHEFFIELD (citado por BACON & BELL, 1953) relatou que a "takadiastase", "transfrutosidase", "invertase de fungo" ou "glucosacarase", que são preparações enzimáticas obtidas de fungo, agiam transferindo radicais β -frutofuranosil da sacarose tanto para aceptores orgânicos adequados, (sacarose), quanto para água. Resultados semelhantes, também, foram obtidos com a invertase de levedura, ou seja, a transferência de resíduo de frutose da sacarose para água ou para substâncias que possuísem um grupo alcoólico primário (BACON, 1954).

Segundo EDELMAN (1954), o termo invertase foi associado com a simples hidrólise da sacarose a glicose e frutose, mas, foi sugerido que o termo sacarase seria mais apropriado, em virtude dos muitos tipos de reações que estas preparações são capazes de catalisar, utilizando a sacarose como substrato. As sacarases foram classificadas em dois grupos principais: glucosacarases (glicosidases: atacam a sacarose pelo lado da glicose) e frutosacarases (frutofuranosidases: atacam a sacarose pelo lado da frutose), tendo sido observada a inibição de algumas sacarases pela glicose e frutose.

Estudos realizados por NELSON & COHN (1924) e PAPADAKIS (1929), com relação às propriedades da invertase do mel, mostraram diferenças significativas quanto à ação desta enzima e da invertase de levedura.

GORBACH & SCHNEITER (1938) demonstraram que a enzima de mel de abelha era uma glicoinvertase. Sua relativa inatividade sobre a rafinose; sua

atividade moderada em relação à melezitose; sua forte atividade sobre a maltose e sacarose, bem como sua inibição pela glicose, confirmaram que uma α -glicosidase era o componente principal desse sistema enzimático. Também, a presença de α -maltosil- β -D-frutósídeo, devido a transferência de glicose, a partir da hidrólise da sacarose para uma molécula intacta de sacarose, reafirmaram esta hipótese.

Segundo WHITE & MAHER (1953), a estrutura do principal oligossacarídeo, formado pela ação da invertase do mel sobre a sacarose, era consistente com a teoria de que a transferência de glicose era parte integrante da reação, o que evidencia o fato de a invertase de mel ser uma glicoinvertase. Com relação aos oligossacarídeos, formados pela ação da invertase do mel e da levedura sobre a sacarose, foi verificado que cinco dos seis oligossacarídeos produzidos pela invertase do mel, diferiam daqueles formados pela invertase de levedura.

De acordo com BEALING & BACON (1953), a transferência repetida de frutose à mesma molécula do oligossacarídeo, poderia resultar na formação de frutosanas, que seriam polímeros derivados de resíduos de n-frutose. A extensão que este processo ocorreria, isto é: se relativamente poucas moléculas grandes ou um número maior de moléculas pequenas seriam produzidas, dependeria da afinidade da enzima por grandes ou pequenos aceptores moleculares. A formação de mais de quatro unidades de frutose a partir de extratos de fungo agindo sobre a sacarose, não foi observada.

GUPTA & BHATIA (1980) detectaram a presença de glicofrutosanas de baixo peso molecular: GF₂, GF₃ e GF₄, em meio de *Fusarium oxysporum*. Tais açúcares também foram observados em meios inoculados com outros fungos. Estes autores postularam que a ação da invertase e da frutossil transferase, na sacarose, poderia ser primeiramente devido à necessidade de glicose para o crescimento do *Fusarium oxysporum*, e que a síntese de glucofrutosanas poderia ser somente uma outra via da reação, que seria utilizada como fonte de energia, quando o suprimento de sacarose do meio fosse inadequado.

Com base nesses dados, GUPTA & BHATIA (1980), demonstraram, conclusivamente, que a frutossiltransferase e a invertase eram enzimas diferentes, e que glicofrutosanas são sintetizadas, principalmente, pela ação da frutossiltransferase. Em geral, as plantas que armazenam frutosanas, possuem ambas as atividades: de frutossiltransferase e hidrolítica. A enzima se ligaria primeiramente à glicose que faz parte da molécula de sacarose. Com a glicose firmemente ligada ao centro ativo, a transferência da frutose tornar-se-ia mais fácil. A inulina não atuaria como aceptor de resíduos frutossil, presumivelmente devido ao seu tamanho ser muito grande e não poder ligar-se ao sítio aceptor que requer moléculas menores de sacarose. Com o aumento na concentração de sacarose acima de 20% no meio, "in vitro", nenhum homólogo das glicofrutosanas maior que GF₄ foi formado, sugerindo que o tamanho do sítio aceptor seja suficiente para acomodar, somente, glicofrutosanas menores que GF₄.

Um modelo tentativo para a transferência de frutose foi proposto por GUPTA & BHATIA (1980), e assume a presença de dois sítios ativos na frutossiltransferase da sacarose: um agindo como doador e o outro como sítio aceptor, com um nucleotídeo atuando como ponte de ligação entre os dois sítios. Sugere-se que a frutose seja transferida do sítio doador para a ponte de ligação, e que este nucleotídeo frutossilado, por sua vez, transfira a parte da frutose à sacarose em seu sítio aceptor para formar GF₂. Na sua presença, o resíduo de frutose da sacarose doadora, seria somente transferida a uma molécula de sacarose aceptor ou a uma glicofrutosana, e não a água. A ponte de nucleotídeo poderia, assim, ser um mecanismo regulador para ativar a enzima, dependendo do tipo de carboidrato disponível no meio, para suprimento de energia ao organismo.

Segundo SHINOHARA, (1986); FUJITA *et alii* (1990a,b; 1994), DUAN *et alii*, (1994), a β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26) é uma enzima que catalisa a transfrutosilação a partir da sacarose, além de possuir também uma ação hidrolítica. A especificidade do aceptor para a transfrutosilação e as estruturas dos produtos transfrutossilados variam, dependendo da fonte da enzima. Os doadores e aceptores do grupo frutosila

podem ser a sacarose ou outros frutooligossacarídeos, além de outros sacarídeos como a rafinose, melezitose; sendo essencial que a glicose e frutose estejam ligadas através de ligações α 1-2 β .

A formação de frutooligossacarídeos foi observada por JUNG *et alii* (1989), e ocorria a partir de reações consecutivas desproporcionais ($GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}$). Quando a sacarose (GF) era utilizada como substrato, somente glicose (G) e 1-kestose (GF_2) eram produzidos, inicialmente. A sacarose agia tanto como doador ou aceptor, assim 1 mol de glicose e 1 mol de 1-kestose eram formados, simultaneamente, a partir de 2 moles de sacarose: $2GF \rightarrow GF_2 + G$. Reações similares foram obtidas com outros substratos como: 1-kestose e nistose (GF_3), respectivamente: $2GF_2 \rightarrow GF_3 + GF$ e $2GF_3 \rightarrow GF_4 + GF_2$, em que GF_4 representa a 1^F frutofuranosil nistose.

DUAN *et alii* (1994), também investigaram o mecanismo de reação enzimática da produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, através do uso da β -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus*. A inibição competitiva pela glicose foi observada a partir da análise cinética para os substratos sacarose, 1-kestose e nistose.

DUAN *et alii* (1993) realizaram um estudo sobre a velocidade de hidrólise de vários substratos, catalisadas pela β -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus*. A concentração dos substratos era de 10 mM, para que houvesse somente hidrólise. A velocidade de hidrólise obedeceu a seguinte ordem: 1-kestose, rafinose, nistose e 1^F- β -frutofuranosil nistose e estaquiase. Observou-se que a glicose não foi liberada a partir da hidrólise da rafinose ou estaquiase. Os sacarídeos hidrolisados eram analisados pela liberação de glicose (método da glicose-oxidase) e CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Através da comparação das estruturas dos sacarídeos obtidos das reações catalisadas pela β -frutofuranosidase, concluiu-se que a enzima era específica para as ligações β -1,2 entre glicose e frutose.

CHANG *et alii* (1994) estudaram a especificidade do substrato quanto à ação hidrolítica da β -frutofuranosidase de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. A atividade de hidrólise da enzima foi monitorada através da liberação de açúcares redutores, utilizando-se como substratos 20% de sacarose, rafinose e estaquiose. Quando a atividade sobre a sacarose era 100, a ação hidrolítica sobre a rafinose e estaquiose eram 88 e 19, respectivamente. A melezitose mostrou-se inativa como substrato para a enzima.

FUJITA *et alii* (1990b) mediram a velocidade de hidrólise de vários oligossacarídeos (10 mM) pela β -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-1, com o intuito de estudar a suscetibilidade do substrato a essa reação enzimática. Na concentração de 10mM, a β -frutofuranosidase catalisou somente reação hidrolítica, e não de transferência. A sacarose foi a mais suscetível. Erllose, rafinose, frutossilxilosídeo, neokestose, lactossilfrutosídeo e estaquiose também foram suscetíveis nesta ordem. Os açúcares 1-kestose, nistose, levanbiose e turanose tiveram dificuldades em ser hidrolisados. No caso da clivagem de neokestose, a sacarose não foi produzida. Este resultado indicou que a enzima hidrolisou somente a ligação β -2,1 da neokestose. Palatinose, inulobiose, maltose e celobiose não foram decompostos pela β -frutofuranosidase. Comparando-se com a ação hidrolítica das β -frutofuranosidases de *Penicillium oxalicum*, os autores observaram que a velocidade de hidrólise da 1-kestose era igual a da rafinose. Quanto à β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans*, a enzima hidrolisou 1-kestose mais rapidamente do que a rafinose, ao contrário, portanto, da β -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-1. Concluindo-se, portanto, que as propriedades enzimáticas das β -frutofuranosidases são diferentes, em função da origem da enzima.

As características da produção de frutooligossacarídeos, através da transfrutossilação enzimática da β -frutofuranosidase, são muito similares para *A. japonicus*, *A. niger* e *Aureobasidium pullulans*. A enzima catalisou a transferência de um resíduo frutossil para um acceptor que tinha 2- β -D frutofuranose, tais como: sacarose, 1-kestose ou nistose. Os principais

oligossacarídeos produzidos foram 1-kestose e nistose. A β -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-1 catalisou a hidrólise e transferência da sacarose para produzir 1-kestose como principal produto de transfrutossilação. Ao contrário da sacarose, 1-kestose e nistose não foram aceptores efetivos para resíduos frutossila da enzima de *Arthrobacter sp* K-1. As β -frutofuranosidases de *A. awamori* e *P. oxalium* produziram dois tipos de trissacarídeos: 1-kestose e neokestose. Isto demonstra que diferentes enzimas apresentam especificidades relativas diferentes para os grupos aceptores (OH-1^F, OH-6^F e OH-6^G) da sacarose, produzindo 1-kestose, 6-kestose e neokestose, respectivamente. Além disso, a água e substratos competem para serem aceptores do resíduo frutossila no sistema de reação. A produção de frutooligossacarídeos aumenta quando a concentração de sacarose se eleva (STRAATHOF *et alii*, 1986; HIRAYAMA *et alii*, 1989; FUJITA *et alii*, 1990a; DUAN *et alii*, 1993).

Frutooligossacarídeos podem ser obtidos a partir da sacarose, através da ação de transfrutossilação das enzimas: β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) e β -D-frutossiltransferase, obtidas de microrganismos e plantas. As β -frutofuranosidases, comumente possuem ambas as atividades de transfrutossilação (U_t) e hidrolítica (U_h). A habilidade de transferência difere em função da linhagem microbiana. A proporção U_t/U_h indica a eficácia relativa da atividade de transfrutossilação de cada linhagem. A produtividade enzimática foi definida como o crescimento celular multiplicado pela correspondente atividade específica. Portanto, para uma produção eficaz de frutooligossacarídeos, é importante que o microrganismo apresente uma alta proporção U_t/U_h e alta produtividade enzimática. Dados experimentais demonstraram que o *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* são as linhagens que melhor apresentam ambos os parâmetros (JUNG *et alii*, 1987 e 1989; HIRAYAMA *et alii*, 1989; HIDAKA & HIRAYAMA, 1991; LEE *et alii*, 1992; PARK & ALMEIDA, 1991).

Outros critérios, além da alta atividade enzimática, entram na seleção de linhagens para produção de β -frutofuranosidase. No caso do *Aureobasidium pullulans*, nem todas as linhagens eram igualmente produtoras de β -

frutofuranosidase. As linhagens também variavam na tendência a tornar-se escuras (negras). Muitas permaneceram no estágio de levedura, brancas a levemente rosadas; outras se agruparam tornando-se negras. A produção de sobrenadantes claros ou escuros variaram em função da linhagem e das condições de crescimento (REESE & MAGUIRE, 1971).

A CPC INTERNATIONAL INC. (1982) desenvolveu um processo de obtenção de frutossiltransferase de *Aureobasidium pullulans*, sem que houvesse produção de pigmentos escuros e polissacarídeos viscosos.

DWORSCHACK & WICKERHAM (1961) e REESE *et alii* (1962) constataram que a β -frutofuranosidase é geralmente produzida através da lise de células de levedura, contudo muitas leveduras e fungos secretam a β -frutofuranosidase no meio. REESE *et alii* (1969 e 1971), descreveram métodos que visavam um aumento na produção da β -frutofuranosidase extracelular, através da utilização de substratos modificados e surfactantes.

Com relação às características da β -frutofuranosidase referentes à temperatura e pH ótimo de atividade, à temperatura e pH de estabilidade, ao peso molecular e efeito de íons metálicos e reagentes químicos na atividade enzimática, verifica-se que essas características bioquímicas variam em função da linhagem microbiana.

JUNG *et alii* (1989) e HAYASHI *et alii* (1990) constataram que a frutossiltransferase extracelular bruta de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245 e a β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 apresentaram, respectivamente, atividade ótima em pH 5,5 a 55°C e em pH 5-6 a 50°C. Quanto ao pH e temperatura de estabilidade, a β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 manteve-se estável em pH 5 a 6, retendo 90% de sua atividade, após 3 horas de incubação, e permanecendo estável em temperaturas inferiores a 50°C, com retenção de 95% em sua atividade. HAYASHI *et alii* (1992b) também relataram que a β -frutofuranosidase bruta de *Aspergillus japonicus* MU-2 apresentou pH e temperatura ótima de

atividade entre 5,0 e 5,5 e 60 e 65°C, respectivamente. A enzima foi estável na faixa de pH 4,0 a 9,0, retendo 90% de sua atividade, após incubação de 15 minutos. Em temperaturas inferiores a 50°C e 15 minutos de incubação, a β -frutofuranosidase manteve-se estável, retendo 86% da atividade a 60°C, mas sendo completamente inativada a 70°C.

Quanto à caracterização da frutossiltransferase extracelular purificada de *Aureobasidium pullulans* C-23, LEE *et alii* (1991) demonstraram que o peso molecular da enzima foi de 170.000 daltons, determinado através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, sendo seu K_m de 0,74 mM, para a sacarose. A enzima foi completamente inibida pelo íon Hg^{2+} , não sendo significativamente afetada pelos cátions Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e nem por EDTA, na concentração de 5mM, mas mostrou-se inativa após tratamento com N-bromosuccinimida nas concentrações de 5, 20 e 50 mM e iodo a 50mM. A enzima apresentou atividade residual de 76 e 41%, em solução de iodo a 5 e 20 mM, respectivamente.

HAYASHI *et alii* (1992e) ao purificarem a β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp* ATCC 20524, obtiveram duas frações E-1 e E-2, cujos pesos moleculares, determinados por filtração em gel Sephadex G-200, foram de 304.000 e 315.000 daltons, respectivamente. O pH e a temperatura ótima de atividade para ambas as frações foram de 5,0-5,5 e 50-55°C, respectivamente. As β -frutofuranosidasas extracelulares purificadas E-1 e E-2 mostraram-se estáveis na faixa de pH 4 a 8, e em temperaturas inferiores a 50°C, sendo completamente inativadas a 70°C, após tratamento térmico de 15 minutos. Os valores de K_m e V_{max} de E-1 e E-2 para sacarose, determinados pelo gráfico de Lineweaver-Burk, foram de 0,34 M e 6,66 μ mol/ml/min. e 0,28M e 8,70 μ mol/ml/min., respectivamente. As atividades enzimáticas de E-1 e E-2 foram inibidas por íons mercúrio, cobre, e p-cloromercuribenzoato nas concentrações de 1mM.

HAYASHI *et alii* (1991, 1992a, 1992c, 1992e, 1994a) estudaram as frações P-1 e P-2 da β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aureobasidium sp* ATCC 20524, quanto às suas características enzimáticas. As frações P-1 e P-2

apresentaram peso molecular de 318.000 e 346.000, respectivamente, determinados por filtração em gel Sephadex G-200. O pH ótimo de atividade das β -frutofuranosidases P-1 e P-2 foram 4,5-5,5 e 4,5-6,0, respectivamente, e a temperatura ótima de atividade para ambas as frações foi de 50-55°C. As β -frutofuranosidases intracelulares purificadas P-1 e P-2 mostraram-se estáveis na faixa de pH 4 a 9, após incubação por 3 horas e em temperaturas inferiores a 50°C, após tratamento térmico de 15 minutos, sendo totalmente inativadas a 70°C. Os valores de K_m e V_{max} para sacarose, de P-1 e P-2 obtidos através do gráfico de Lineweaver-Burk foram 0,47M e 6,84 $\mu\text{mol/ml/min}$ e 0,65M e 8,73 $\mu\text{mol/ml/min.}$, respectivamente. As atividades de P-1 e P-2 foram estimuladas pelos íons Ba^{2+} e Ca^{2+} , em concentrações de 1mM e inibidas pelo ρ -cloromercuribenzoato na concentração de 1mM. A fração P-1 apresentou atividade residual de 26%, 44%, 12% e 6%, respectivamente, em soluções de 1 mM de AgNO_3 , ZnSO_4 , Pb(OAc)_2 e CuSO_4 .

LEE *et alii* (1992) relataram que a frutossiltransferase intracelular purificada de *Aureobasidium pullulans* C-23 apresentou peso molecular de 190.000 daltons, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e K_m de 0,43 mM para sacarose. A enzima apresentou pH e temperatura ótima de atividade de 5,0 e 60°C, respectivamente, mantendo-se estável em pH de 2,5 a 12, após 48 horas de incubação a 4°C e em temperaturas inferiores a 55°C, após tratamento térmico de 30 minutos, sendo completamente inativada a partir de 70°C. Quanto ao efeito dos cátions Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , na concentração de 5mM, os autores observaram pouco ou nenhum efeito inibitório sobre a frutossiltransferase, mas, constataram que a enzima foi totalmente inibida pelo íon Hg^{2+} . Também, a enzima foi inativada pelo reagente N-bromosuccinimida nas concentrações de 5, 20 e 50 mM e iodo a 50mM, apresentando atividade residual de 76 e 41%, em solução de iodo a 5 e 20 mM, respectivamente, não sendo significativamente afetada por ρ -cloromercuribenzoato.

A β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus niger* ATCC 20611 foi estudada por HIRAYAMA *et alii* (1989), sendo constatado que seu peso molecular foi de 340.000 daltons, determinados por filtração em gel Sephadex G-200. Através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, a enzima apresentou uma única banda, cujo peso molecular foi estimado em 100.000 Da; tais diferenças, sugerem a presença de subunidades na sua estrutura. O pH e a temperatura ótima de atividade da enzima foram, respectivamente, 5,0-6,0 e 50-60°C. A β -frutofuranosidase mostrou-se estável em pH de 4,5 a 10,0, após 30 minutos de incubação a 40°C, mantendo-se com 81% de sua atividade em temperaturas inferiores a 50°C, após 30 minutos de reação. A influência dos íons metálicos Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , e das substâncias químicas p -cloromercuribenzoato, anilina e EDTA na atividade enzimática, demonstraram que somente o íon mercúrio inativou a enzima na concentração de 1mM, enquanto a ação dos demais inibidores foi insignificante. PARK & ALMEIDA (1991) observaram que a transfrutossilase extracelular de *Aspergillus niger* apresentou pH ótimo de atividade e estabilidade na faixa de 5,5 a 6,0, sendo a temperatura ótima de atividade de 55°C.

CHANG *et alii* (1994) observaram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 apresentou pH e temperatura ótima de 5-6 e 50°C, respectivamente, pH de estabilidade entre 5 a 8, após incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, K_m de 0,53 M para o substrato sacarose e peso molecular de 87.000 Da, através de filtração em gel. A atividade enzimática foi significativamente inibida por mercúrio, p -hidroximercuribenzoato e N-bromosuccinimida, nas concentrações de 0,25 mM, 0,25mM e 0,5mM, respectivamente.

FUJITA *et alii* (1990b) relataram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Arthrobacter sp* K-1, apresentou peso molecular de 52.000 e 51.000, determinados, respectivamente, através dos métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e filtração em gel Ultragel AcA 44. O pH e a temperatura ótima de atividade foram de 6,5-6,8 e 55°C, respectivamente. A enzima mostrou-

se estável na faixa de pH 5,5 a 10,0 a 40°C, após 2 horas de incubação. A β -frutofuranosidase apresentou estabilidade térmica em temperaturas inferiores a 45°C, a pH 6,5, após 30 minutos de incubação, mantendo cerca de 72% de sua atividade original após incubação a 60°C. Quanto ao efeito de íons metálicos e outros reagentes na atividade da β -frutofuranosidase, em concentrações de 1 mM, os referidos autores observaram que a enzima foi quase completamente inativada pelos íons Cu^{2+} , Ag^+ , e Hg^{2+} , constatada através de suas atividades relativas que foram, respectivamente, 1,1%, 0,9% e 0,5%. Os íons Zn^{2+} , Sn^{2+} e Pb^{2+} , também inibiram consideravelmente a β -frutofuranosidase, cujas atividades relativas foram 18,3%, 22,2% e 33,9%, respectivamente.

HAYASHI *et alii* (1992c e 1993) relataram que a β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2 apresentou, respectivamente, pH e temperatura ótima de atividade na faixa de 5,5 a 6,0 e 60 a 65°C. A enzima mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 60°C, restando 94% de sua atividade entre as temperaturas de 50 a 60°C, após 15 minutos de incubação, havendo uma redução de 33% em relação à atividade máxima a 70°C. A enzima apresentou-se estável na faixa de pH 4,0 a 9,0, após 3 horas de incubação. Os parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} para a sacarose, determinados através de gráfico de Lineweaver-Burk, foram, respectivamente, 210mM e 0,65 $\mu\text{mol/ml/min}$. O peso molecular da β -frutofuranosidase intracelular purificada foi de 304.000 Da, através de filtração em gel Sephadex G-200, embora a preparação nativa tenha apresentado três bandas com pesos moleculares de 95.000, 65.000 e 37.000 daltons, respectivamente, após tratamento com 2-mercaptoetanol em gel de poliacrilamida. A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, mostrou uma única banda para a enzima nativa. HAYASHI *et alii* (1993) ao estudaram o efeito de íons metálicos na atividade da β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2, constataram que a enzima apresentou atividade relativa de 48%, 7%, 2%, 0%, 32% e 0% , na presença dos íons Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^+ , respectivamente, na concentração de 1 mM.

A β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 foi estudada por DUAN *et alii* (1993), sendo constatado que seu peso molecular foi de 240.000 daltons, determinados por filtração em gel Sephacryl S-300. Através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, a enzima apresentou duas bandas, cujos pesos moleculares foram estimados em 115.000 e 236.000 daltons, respectivamente. O pH e a temperatura ótima de atividade da enzima foram, respectivamente, 5,4 e 60°C. A β -frutofuranosidase mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 56°C, após 20 minutos de incubação e na faixa de pH 7,0 a 8,5, após 2 horas de incubação a 37°C. A influência de íons metálicos e substâncias químicas na atividade enzimática, demonstraram que a enzima foi completamente inativada pelos íons Ag^+ e Hg^+ , nas concentrações de 5mM, enquanto os íons Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e *p*-cloromercuribenzoato não produziram nenhum efeito na atividade enzimática na concentração de 5mM.

NISHIZAWA *et alii* (1980) ao caracterizarem parcialmente a β -frutofuranosidase de *Fusarium oxysporum*, verificaram que havia duas isoenzimas denominadas P-1 e P-2, que correspondiam, respectivamente, as enzimas obtidas do meio de cultura na fase micelial (estágio inicial de crescimento) e fase conidial (estágio final de crescimento), cujos pesos moleculares variaram em função da metodologia e temperaturas utilizadas. Através da filtração em gel Sephadex G-200 a 4°C, os pesos moleculares de P-1 e P-2 foram, respectivamente, 295.000 e 266.000 daltons. A 25°C, os pesos moleculares de P-1 e P-2 foram 224.000 e 158.000 Da, respectivamente, indicando que as enzimas apresentavam subunidades estruturais e que a associação e dissociação dessas subunidades eram dependentes da temperatura. A enzima P-2 ao ser submetida à filtração em gel de Sepharose 4B-Guanidina.HCl, à temperatura ambiente, revelou uma única proteína com peso molecular de 63.000, sugerindo que P-2 seja um dímero ou tetrâmero de 63.000 a 25°C e 4°C, respectivamente. Os pesos moleculares de P-1 e P-2, determinados através da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foram, respectivamente, 108.000 e

84.000 daltons, com uma única banda para ambas as enzimas. Quando as enzimas foram submetidas a ligações cruzadas com DMS (dimetilsuberimidato) e, posteriormente, sujeitas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, P-1 apresentou três bandas de proteína e P-2, duas bandas, demonstrando que cada enzima tinha uma subunidade estrutural, composta presumivelmente de subunidades idênticas. Os pesos moleculares de P-1 e P-2, determinados através de ultracentrifugação foram, respectivamente, 202.000 e 140.000 Da. Quanto aos valores de K_m para a sacarose, as isoenzimas P-1 e P-2 apresentaram, respectivamente, K_m de 4,4 mM e 2,1 mM.

Segundo HIRAYAMA *et alii* (1989); FUJITA *et alii* (1990b) e HAYASHI *et alii* (1991c, 1992c), a β -frutofuranosidase de *Aspergillus japonicus* é uma glicoproteína que contém cerca de 20% (p/p) de carboidratos, comparados aos teores de glicose das β -frutofuranosidasas de *Arthrobacter sp* K-1, *Aspergillus niger* e *Aureobasidium*, que são de 2,4%, 20% e 30-53%, respectivamente.

UHM *et alii* (1987) constataram que três subunidades da β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* eram glicoproteínas com teores de 33, 40 e 20% de carboidratos, respectivamente.

HAYASHI *et alii* (1992d,f) estudaram o efeito da deglicosilação nas propriedades da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* ATCC 20524. A remoção do carboidrato da enzima foi realizada pela endo- β -N-acetilglucosaminidase F, com redução no teor de carboidrato de 53% (p/p) para 15% (p/p). A estabilidade da β -frutofuranosidase deglicosilada em pH 4 a 7 e na temperatura de 40 a 50°C foi diminuída, e o valor de K_m para a sacarose foi aumentado de 0,65 para 1,43M. Os autores concluíram que o carboidrato protege a enzima da proteólise, além de exercer um papel fundamental na estabilização das enzimas.

2.2. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

2.2.1. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL

Frutooligossacarídeos são polímeros de D-frutose unidos através de ligações β -(2 $\rightarrow$ 1) com uma molécula de sacarose terminal. O grau de polimerização pode variar de 2 a 35 unidades. Polímeros de cadeia longa tendo grau de polimerização maior que 35 são referidos como inulina. Há diversas fontes naturais de frutooligossacarídeos, estando algumas listadas no Quadro 1. A quantidade de frutooligossacarídeos e o grau de polimerização variam grandemente com a fonte. Bulbos de dália contêm uma quantidade significativa deste carboidrato de reserva com um grau de polimerização maior que a maioria dos vegetais. A chicória apresenta uma quantidade substancial do carboidrato de reserva com um grau de polimerização médio de 18. Tubérculos de alcachofra-de-jerusalém possuem um alto teor de frutooligossacarídeos, mas, o grau de polimerização tende a ser menor do que ao da chicória ou dália. Outras plantas como o trigo, triticale e centeio apresentam frutooligossacarídeos com grau de polimerização de 2 a 7, mas a maioria das frutanas são do tipo ramificada com ligações glicosídicas β (2 $\rightarrow$ 6) (BACON & EDELMAN, 1951; EDELMAN & BACON, 1951; EDELMAN, 1956; EDELMAN & JEFFORD, 1968; CARPITA *et alii*, 1989; HOUSLEY *et alii*, 1989; MODLER, 1994).

Há na natureza três trissacarídeos isômeros identificados como 1-kestose (1^F- β -frutosilsacarose), 6-kestose (6^F- β -frutosilsacarose) e neokestose (6^G- β -frutosilsacarose), que são potencialmente intermediários na síntese de oligo e polifrutanas. São denominadas inulinas, quando β (1-2) ligações glicosídicas predominam ou levanas, quando β (2-6) ligações glicosídicas estão presentes. Frutanas são oligossacarídeos ou polissacarídeos de frutose contendo uma única molécula de glicose. Muitas enzimas que produzem frutanas são relatadas: a inulosacarase (EC 2.4.1.99) que converte a sacarose em frutanas (inulina) com β (2 $\rightarrow$ 1) ligações e D-glicose, e a levansacarase (EC 2.4.1.10) que converte a

sacarose em frutanas (levanas) com ligações β (2→6). A primeira etapa na síntese de frutana é catalisada pela sacarose frutossiltransferase, que transfere grupos frutósila da sacarose (doador) para sacarose (acceptor) produzindo trissacarídeo e glicose (CHATTERTON *et alii*, 1989a; BALKEN *et alii*, 1991 e SIMS *et alii*, 1991).

Quadro 1
Fontes Vegetais de Frutooligossacarídeos

Planta	Teor	
	Base Fresca	Base Seca
	(%)	(%)
Chicória	24	73,6
Alcachofra-de-jerusalém	22	74
Dália	13	72
Cebola	2-5	70
Alho	5-10	50
Alho-porro	2-5	70
Trigo	0,8	1,0

Fonte: Modler, 1994

Segundo WAGNER & WIEMKEN (1987); CHATTERTON *et alii* (1989a,b); FUCHS (1991); JOHN (1991), SMEEKENS *et alii* (1991) e MODLER (1994), plantas das famílias *Compositae* e *Gramineae* armazenam carboidratos, no outono, através da 1-frutossiltransferase que transfere a frutose da sacarose para o trissacarídeo inicial conhecido como 1^F-frutosilsacarose. O processo de polimerização continua até a inulina precipitar dentro do vacúolo. Durante o inverno, vegetais como chicória, dália e tubérculos da alcachofra-de-jerusalém, respiram mais lentamente, havendo leve alteração no perfil dos frutooligossacarídeos. Essas modificações tornam-se mais rápidas com a chegada da primavera. Inulinases, como a $\beta(2\rightarrow1)$ frutana-1-frutanohidrolase são ativadas

e despolimerizam os polímeros de frutana, produzindo frutose que então é transferida para o citoplasma celular como fonte de energia. Se os tubérculos de alcachofra são colhidos no outono e armazenados para processamento durante os meses de inverno, alterações substanciais podem ocorrer no perfil dos frutooligossacarídeos, dependendo das condições de armazenagem. Tubérculos lavados frescos e estocados em sacos de polietileno sofrem alguma despolimerização dos frutooligossacarídeos, quando armazenados a 2°C. Polímeros de cadeia longa (grau de polimerização maior que 9) são reduzidos de 30-39% para 21,4% após 18 semanas de estocagem, com acúmulo de frações com grau de polimerização 1. Este aumento em compostos com grau de polimerização 1 é provavelmente um reflexo da baixa taxa de respiração a 2°C. Armazenamento de tubérculos a 5°C resulta num declínio constante dos polímeros de cadeia longa e acúmulo substancial de frações com grau de polimerização de 2 a 4, após 68 semanas de estocagem. Estes dados sugerem que tubérculos frescos devem ser processados imediatamente, se frutooligossacarídeos de cadeia longa são desejados, como no caso de alimentação animal, ao contrário dos vegetais armazenados por longos períodos, que são adequados para uso em humanos. Tubérculos de alcachofra-de-jerusalém podem ser facilmente incorporados na ração animal, contudo a aplicação em alimentos é limitada devido ao flavor e coloração indesejáveis. Também, raízes de chicória frescas são muito amargas, porém, alguns processos foram desenvolvidos para remover esses componentes, visando a obtenção de produtos funcionais com larga aplicação nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

Estudos conduzidos por SPIEGEL *et alii* (1994), e MODLER (1994), constataram que apesar de os alimentos naturais conterem frutooligossacarídeos e considerando os hábitos alimentares usuais, torna-se difícil a ingestão da dose diária recomendada de oligossacarídeos, a partir de alimentos naturais, que é de aproximadamente 0,8g/dia/130 libras de peso corpóreo, nos Estados Unidos. Portanto, a ingestão de oligossacarídeos suplementares pode ser benéfico para

idosos, pessoas que ocupam cargos estressantes e pessoas que desejam manter o sistema digestivo saudável.

O interesse na preparação enzimática de 1-kestose, adoçante não nutritivo em potencial e seus homólogos, a partir da sacarose, tem sido recente. MANLEY-HARRIS & RICHARDS (1991), relataram a termólise a 100°C da sacarose amorfa através da ação de um catalisador ácido (ácido cítrico), com a formação de três kestoses e seus α -frutofuranosil anômeros.

Atualmente, os frutooligossacarídeos são comercialmente disponíveis nos Estados Unidos (ZeaGen Corp., Westminster, Colo.). Oligossacarídeos provenientes da soja foram considerados alimentos GRAS (generally recognized as safe) pela Food and Drug Administration. Os frutooligossacarídeos também foram aceitos como fibra alimentar pelas autoridades científicas francesas, CEDAP, em 13-09-95. Na França a Direção Geral do Consumidor, da Competência e da Repressão a Fraude reconheceu em 04-01-95 que os frutooligossacarídeos (marca Actilight) estimulam o crescimento e a atividade das bifidobactérias do intestino humano (MODLER, 1994; ALEGRET, 1996).

Frutooligossacarídeos de vários graus de polimerização estão sendo produzidos através da hidrólise parcial da inulina da chicória pela Warcoing S.A e Raffinerie Tirlemontoise S.A. da Bélgica, sob os nomes comerciais de fibruline e raftilose (L60, L85, L95 e P95), respectivamente. A Suiker Unie, da Holanda, iniciou também a produção de fibruline (FUCHS, 1991).

2.2.2. FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR SÍNTESE ENZIMÁTICA

Frutooligossacarídeos podem ser produzidos, a partir da sacarose, pela ação das enzimas microbianas β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) ou β -frutosiltransferase (E.C. 2.4.1.9) e consistem principalmente de 1-kestose (GF₂),

nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), em que uma a três unidades de frutose são unidas através de ligações glicosídicas β -2,1 a unidades de frutose da sacarose, respectivamente (BINKLEY & ALTENBURG, 1965; DZIEZAK, 1986; FISHBEIN *et alii*, 1988; LEE *et alii*, 1992 e YUN & SONG, 1993). Eles diferem no peso molecular ou na estrutura química das frutanas originárias de plantas ou levanas microbianas (OHTSUKA *et alii*, 1992; BARTHOMEUF, & POURRAT, 1995).

A reação de transfrutoseilação, que é responsável pela produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, ocorre em vários microrganismos, porém, esta atividade de transferência é quantitativamente diferente entre as diferentes linhagens microbianas. As β -frutofuranosidases, usualmente, possuem as atividades de transfrutoseilação (U_t) e de hidrólise (U_h). A relação entre U_t/U_h indica a capacidade de transfrutoseilação de cada linhagem. Para a produção eficiente de frutooligossacarídeos deve haver uma alta proporção de U_t/U_h e alta produtividade enzimática. A transfrutoseilação é maior com o aumento na concentração de sacarose, havendo uma competição entre a água e outros substratos pela transferência de radicais frutoseil nas reações catalisadas pelas β -frutofuranosidases (HIDAKA *et alii*, 1988; HIRAYAMA *et alii*, 1989; CHANG *et alii*, 1994).

Segundo YUN *et alii* (1990 e 1992a), a produtividade máxima de frutooligossacarídeos foi atingida com β -frutofuranosidase de *Aureobasidium pullulans*, utilizando-se concentrações de 770 a 850 g/litro de sacarose. CHANG *et alii* (1994), FUJITA *et alii* (1990a) e HIRAYAMA *et alii* (1989) obtiveram alta capacidade de transfrutoseilação em concentrações de 50% de sacarose com β -frutofuranosidases de *Aspergillus oryzae*, *Arthrobacter sp. K-1* e *Aspergillus niger*, respectivamente.

Também foi demonstrado que β -frutofuranosidases de diferentes linhagens microbianas revelaram especificidades relativas diferentes para os três

receptores alcoólicos primários da sacarose (OH-1^F, OH-6^F e OH-6^G) (HIDAKA *et alii*, 1988; HIRAYAMA *et alii*, 1989).

Particularmente, frutooligossacarídeos obtidos a partir da sacarose, através da ação de microrganismos, têm tido uma importância industrial que vem crescendo gradualmente devido a sua produção ser relativamente simples, seu sabor ser semelhante à sacarose e ser um adoçante de baixa caloria (YUN *et alii*, 1994a). Esses açúcares representam 20 a 40% da doçura da sacarose e não são digeríveis no intestino humano (LEE *et alii*, 1992).

Frutooligossacarídeos de origem microbiana têm sido particularmente estudados devido aos seus efeitos fisiológicos específicos em humanos, especialmente a estimulação do crescimento benéfico das bifidobactérias no trato digestivo, alívio da constipação intestinal, redução no colesterol total e lipídios do soro sanguíneo, além de uma melhoria no estado geral do indivíduo. Os frutooligossacarídeos também são utilizados como estabilizantes e agentes espessantes na produção de adoçantes (HIDAKA *et alii*, 1986).

As β -frutofuranosidases de fungos tais como *Penicillium oxalicum* (YASUDA *et alii*, 1986), *Penicillium frequentans* (USAMI *et alii*, 1991), *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIDAKA *et alii*, 1988), *Aspergillus sydowi* (MURAMATSU *et alii*, 1988), *Aureobasidium sp* 20524 (HAYASHI *et alii*, 1991c), *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et alii*, 1992b,c e 1993), e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994), apresentaram alta atividade de transfrutossilção.

A produção industrial de frutooligossacarídeos, a partir da sacarose, tem sido realizada através da β -frutofuranosidase microbiana oriunda de *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans* (HIRAYAMA *et alii*, 1989; JUNG *et alii*, 1989; HAYASHI *et alii*, 1990; YUN *et alii*, 1990 e 1992a; HAYASHI *et alii*, 1991c).

Com relação ao *Aureobasidium pullulans*, DESHPANDE *et alii* (1992) relataram que esse microrganismo é um saprófita ubíquo que ocorre em diversas plantas e frutas tropicais. É popularmente conhecido como levedura negra, devido a produção de melanina, sendo muito comum seu aparecimento em zonas

temperadas, embora haja relatos de sua ocorrência no mediterrâneo e zonas áridas. Também foi isolado de regiões tropicais, especialmente terras pantanosas e solos de florestas. Outros locais incluem água fresca, sedimentos marinhos e água do mar. PITT & HOCKING, (1985) detectaram a presença de *Aureobasidium pullulans* numa grande variedade de alimentos, mas raramente causaram sua deterioração. Sua prevalência em alimentos congelados foi constatada, estando associado com a deterioração de carnes e queijos armazenados sob refrigeração. Esse microrganismo foi isolado em maçãs, cerejas, morango, repolho, azeitonas verdes e produtos cítricos.

O *Aureobasidium pullulans* foi exaustivamente estudado quanto a seus aspectos ecológicos (COOKE, 1959), taxonômicos (COOKE, 1962), fisiológicos (COOKE & MATSUURA, 1963) e estruturais (DURRELL, 1967; PECHAK & CRANG, 1977). Segundo DESHPANDE *et alii* (1992), linhagens de *Aureobasidium pullulans*, isoladas de humanos, não provaram ser patogênicas em testes com animais. O *Aureobasidium pullulans* foi previamente classificado como fungo imperfeito, família Moniliales. Artigos recentes o incluem como Ascomycetes, embora um estágio perfeito não tenha sido encontrado. A nova classificação insere o *Aureobasidium pullulans*, na família Dothideales. Há ainda confusão em relação à terminologia deste microrganismo. *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud é atualmente a terminologia aceita. Outros sinônimos são *Pullularia pullulans* (De Bary) Berkhout e *Dematium pullulans*. O estágio imperfeito apresenta uma morfologia diversa. O microrganismo mostra um polimorfismo, podendo crescer como levedura ou micélio, dependendo das condições ambientais. A formação de clamidosporos de cor escura é uma característica. As colônias são lisas e eventualmente cobertas por um material mucilagenoso. Inicialmente são amareladas, cor creme, rosa clara ou marrom claro. As colônias tornam-se negras devido a formação de clamidosporos que apresentam grandes depósitos de melanina num estágio mais avançado. As hifas são hialinas, lisas, com paredes finas, e células frequentemente mais largas que longas, formando um micélio compacto. *Aureobasidium pullulans* pode ser

reconhecido por suas conídias (blastoporos) lineares e pela presença de cadeias segmentadas de clamidosporos de paredes espessas (LINGAPPA *et alii*, 1963; DURRELL, 1967; WICKERHAM & KURTZMAN, 1975; PECHAK & CRANG, 1977; DESHPANDE *et alii*, 1992). A faixa de temperatura para seu crescimento é de 2 a 35°C, com temperatura ótima de 25°C. Algumas linhagens chegaram a desenvolver-se a temperaturas de -5°C, sendo sua resistência ao calor muito baixa (PITT & HOCKING, 1985).

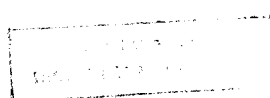
A absorção e acúmulo de metais pesados por microrganismos têm recebido enorme atenção no contexto biotecnológico, como meio alternativo ou auxiliar das técnicas convencionais de remoção de metais e/ou recuperação de efluentes poluídos. Compostos excretados ou derivados da biomassa microbiana, como a melanina, podem ser um sistema eficiente de bioabsorção. MOWLL & GADD (1984); GADD & ROME (1988) demonstraram que uma variedade de metais pesados podem induzir ou acelerar a produção de melanina em *Aureobasidium pullulans*, e que formas celulares melanizadas, como os clamidosporos, podem apresentar alta capacidade de absorção de metais com todas as ligações metálicas localizadas na parede celular. Segundo GADD (1983), o *Aureobasidium pullulans* exibe considerável tolerância a metais pesados, sendo frequentemente isolado de ambientes contaminados com cádmio, chumbo e zinco, não tendo sido observada a produção de nenhum halo de inibição em resposta ao zinco e, somente, um pequeno halo em presença de altas concentrações de cádmio. O cobre foi o metal mais tóxico a esse microrganismo.

O *Aureobasidium pullulans* é industrialmente importante devido a sua capacidade de produzir o polissacarídeo pululana, que é utilizado como envoltório e ingrediente de alimentos, além de sua utilização na indústria papeleira, madeireira, farmacêutica e de cosméticos (SILMAN *et alii*, 1990; DESHPANDE *et alii*, 1992; BADR-ELDIN *et alii*, 1994).

Estudos conduzidos por FEDERICI (1982), com 198 linhagens de *Aureobasidium pullulans*, detectaram sua habilidade de liberar extracelularmente enzimas hidrolíticas (amilases, lipases, proteases, ureases e

fosfatases) no meio de cultura. As enzimas de *Aureobasidium pullulans* mais amplamente estudadas foram as β -frutofuranosidases, xilanase, pululanase e glicoamilase (DESHPANDE *et alii*, 1992). As condições culturais para produção de β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* foram relatadas por HAYASHI *et alii* (1991d) e CPC INTERNATIONAL INC. (1982), sendo a sacarose, nos teores de 10-20% (p/v), a melhor fonte de carbono para a produção dessa enzima. Em concentrações mais elevadas, houve uma redução no crescimento do *Aureobasidium sp*. Glicose e frutose também foram boas fontes de carbono na produção da β -frutofuranosidase. Extrato de levedura a 1,5-2,0% (p/v) mostrou ser a melhor fonte de nitrogênio para a produção da enzima e crescimento celular. A adição de NaNO_3 (1 a 2%, p/v) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 a 1,5%, p/v) ao meio de cultura, aumentaram a atividade enzimática intracelular. Estudos realizados por BADR-ELDIN *et alii* (1994), quanto à produção de polissacarídeos pelo *Aureobasidium pullulans*, demonstraram que a natureza das fontes de carbono e nitrogênio influenciavam na formação de pululana, bem como havia diferenças na capacidade de assimilação das diversas fontes de carbono e nitrogênio na síntese de polissacarídeos, em função das diferentes linhagens de *Aureobasidium pullulans*.

Outros microrganismos, também, foram estudados com relação à biossíntese de frutooligossacarídeos, tais como: *Aspergillus oryzae* (PAZUR, 1952), *Penicillium spinulosum* (BEALING, 1953), *Candida krusei* (EDELMAN, 1954), *Claviceps purpurea* (DICKERSON, 1972), *Phytophthora parasitica* (HANKIN & MCINTYRE, 1977), *Streptococcus mutans* (WENHAM *et alii*, 1979), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1980), *Arthrobacter sp* (FUJITA *et alii*, 1990a,b), *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et alii*, 1992b,c; HAYASHI *et alii*, 1993).



2.2.3. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Os frutooligossacarídeos estão sendo comercialmente produzidos a partir da sacarose, através do uso de enzimas solúveis ou células imobilizadas (JUNG *et alii*, 1987; HIDAKA *et alii*, 1988; YUN *et alii*, 1990 e 1992a). Atualmente, há dificuldade em atender ao aumento na demanda por frutooligossacarídeos por estes processos, ou seja: sistema em batelada com enzima solúvel que apresenta baixa produtividade, enquanto o sistema contínuo com células imobilizadas possui baixa operacionalidade, resultado de uma restrição difusional na matriz do gel, além dos aspectos de preparação e descarte após inativação (YUN *et alii*, 1995). Refletindo esta situação, deve-se salientar que a produtividade é obviamente o fator crítico para produção comercial de frutooligossacarídeos. Para superar este problema, vários pesquisadores têm tentado imobilizar a frutossiltransferase solúvel em diversos suportes, tais como: vidro poroso (HAYASHI *et alii*, 1991a,b); sílica (HAYASHI *et alii*, 1992a, 1993); DEAE-celulose (HAYASHI *et alii*, 1994a); alginato (HAYASHI *et alii*, 1994b); trocadores iônicos de alta porosidade (YUN *et alii*, 1995). Contudo, um sistema prático que atenda às exigências industriais não foi relatado até o presente.

Atualmente, a produção industrial de frutooligossacarídeos é realizada através de β -frutofuranosidase microbiana derivada de *Aspergillus niger* (HIDAKA *et alii*, 1988) ou *Aureobasidium pullulans* (HAYASHI *et alii*, 1991c). Um problema com a β -frutofuranosidase é que a atividade desta enzima é fortemente inibida pela glicose que é gerada como subproduto (JUNG *et alii*, 1989 e 1993), interrompendo a reação enzimática e deixando cerca de 10% de sacarose sem ser convertida. Portanto, o teor máximo em base seca de frutooligossacarídeos nos produtos comerciais é de 55 a 60% (YUN *et alii*, 1990).

A sacarose é um substrato de baixo custo, que vem sendo utilizado como doador de frutose, na síntese de frutooligossacarídeos de cadeia curta, comumente referidos como “neosugar” (HIDAKA *et alii*, 1986; HIDAKA *et alii*, 1988). A síntese de “neosugar” é obtida através da utilização de β -

frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) derivada do *Aspergillus niger*. Estes açúcares são produzidos comercialmente pela Meiji Seika Kaisha Ltd. do Japão e estão disponíveis tanto na forma bruta quanto purificada, 55% e 100% de “neosugar”, respectivamente (HIDAKA *et alii*, 1988); sendo a forma purificada obtida através de separação em colunas cromatográficas de troca iônica. Métodos mais econômicos de produção de frutooligossacarídeos com alto teor de kestose e nistose vêm sendo pesquisados, através da utilização das enzimas glicose oxidase e glicose isomerase, que visam a redução ou eliminação da glicose (CPC INTERNATIONAL INC. 1981; JUNG *et alii*, 1993; YUN *et alii*, 1993 e 1994a). Recentemente, BARTHOMEUF & POURRAT (1995) isolaram uma linhagem de *Penicillium rugulosum* que possuía um sistema enzimático misto constituído de frutotransferase e uma glicosidase (Classes 2 e 3, respectivamente, na nomenclatura de enzimas) que produziram altos teores de frutooligossacarídeos, a partir da sacarose. Foram produzidos 53,15% de nistose; 22,80% de frutofuranosil nistose e 7,87% de 1-kestose, a partir de solução de sacarose a 65%, em 10 horas de fermentação. Também, HANG *et alii* (1995) selecionaram uma linhagem de *Aspergillus foetidus*, cultivada em meio semi-sólido de resíduo de maçã, que era capaz de converter sacarose em um xarope de frutooligossacarídeos, contendo valores superiores a 50% de kestose. A eficiência de produção variou de 26 a 47%, dependendo da concentração de sacarose e do tempo de reação.

HIDAKA *et alii* (1988), HIDAKA & HIRAYAMA (1991) constataram que os frutooligossacarídeos poderiam ser preparados de uma maneira mais eficaz a partir de altas concentrações de sacarose, através da ação de uma enzima com maior habilidade de transfrutossilacção. A ação da β -frutofuranosidase, obtida da linhagem de *Aspergillus niger*, em solução de sacarose 50% (p/v), fornece uma mistura de frutooligossacarídeos constituídos de 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F β -frutofuranosilnistose (GF₄). A produção industrial foi desenvolvida a partir de uma solução de sacarose 50-60% (p/v) que passa através de uma coluna com células de *Aspergillus niger*, imobilizadas onde ocorre o processo de

transfrutossilacão, seguida de passagem por coluna de troca iônica para descoloração e dessalinização. Há, atualmente, dois tipos de frutooligossacarídeos comerciais disponíveis no mercado: “neosugar” G e “neosugar” P. O “neosugar” G é obtido da reação enzimática de transfrutossilacão da sacarose, seguida do processo de descoloração e dessalinização. O “neosugar” P é preparado a partir do “neosugar” G, através da remoção dos monossacarídeos e dissacarídeos. O “neosugar” G consiste de 35% (p/p) de glicose e frutose, 10% (p/p) de sacarose e 55% (p/p) de frutooligossacarídeos, constituídos de GF₂, GF₃ e GF₄ nas concentrações de 25, 25 e 5% (p/p), respectivamente. Similarmente, o “neosugar” P contém cerca de 95% (p/p) de frutooligossacarídeos, composto de GF₂, GF₃ e GF₄ nas concentrações de 40, 45 e 10%, respectivamente. Os frutooligossacarídeos apresentam características físicas e fisiológicas que o tornam adequados para uso na alimentação humana e animal. Também são incolores e inodoros. São adoçantes de alta qualidade. A doçura do “neosugar” G e “neosugar” P é de 60% e 30%, respectivamente, em relação à sacarose. Ambos são estáveis a pH neutro e a temperaturas acima de 140°C.

2.2.4. HIDRÓLISE DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A maioria dos estudos metabólicos de utilização dos fatores bifidogênicos foram conduzidos em experimentos “in vitro”. Os estudos “in vivo” (animal) são limitados e muitas das informações em humanos carecem de maiores pesquisas (MODLER, 1994).

Os frutooligossacarídeos não são hidrolisados em ratos ou humanos pelas enzimas digestivas da mucosa intestinal e amilases dos homogenatos pancreáticos (OKU *et alii*, 1984; HIDAKA *et alii*, 1986), mas, frutooligossacarídeos de cadeia longa (inulina) parecem sofrer alguma hidrólise (18-26%) e absorção em experimentos com animais (ratos), realizados por NILSSON & BJORCK, (1988). Testes de tolerância a açúcares, em indivíduos

saudáveis, confirmaram que os frutooligossacarídeos não são digeríveis e nem absorvidos, ao contrário dos seus componentes monossacarídeos, frutose e glicose (HIDAKA & HIRAYAMA, 1991).

OKU *et alii* (1984) e TOKUNAGA *et alii* (1986), também, demonstraram em estudos com ratos “in vitro”, que os frutooligossacarídeos não são hidrolisados pelas α -amilases e enzimas digestivas na mucosa intestinal, e que mesmo a ingestão prolongada desses açúcares não induzem a produção de enzimas hidrolíticas no intestino e em outros órgãos. A digestão de GF₂ e GF₃ foi investigada utilizando-se homogenatos de pâncreas e da mucosa intestinal, tendo-se observado que o GF₂ não foi hidrolisado pela amilase pancreática, e que somente uma pequena quantidade de GF₂ foi digerida pelo homogenato da mucosa do intestino delgado. Com relação ao GF₃, a hidrólise foi ainda menor, verificando-se, portanto, que os frutooligossacarídeos tornam-se indigeríveis quando contêm mais unidades de frutose por molécula.

TOKUNAGA *et alii* (1986) observaram que doses elevadas de “neosugar” (10-20% da dieta) podem induzir diarreia em ratos, sugerindo que estes açúcares não são digeridos nem absorvidos no trato gastrintestinal superior.

Os frutooligossacarídeos que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas de mamíferos, são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias, um anaeróbio não formador de esporo, gram positivo, que é predominante no trato intestinal de humanos e alguns animais. Esses microrganismos exercem o efeito de proteção na proliferação ou infecção de bactérias nocivas (HIDAKA *et alii*, 1986 e MURAMATSU *et alii*, 1992).

De acordo com MURAMATSU *et alii* (1992), há poucos estudos com relação às propriedades das β -frutofuranosidases purificadas, que catalisam a hidrólise de frutooligossacarídeos. McKELLAR & MODLER (1989) relataram que algumas linhagens de bifidobactérias utilizaram frutooligossacarídeos e produziram β -frutosidases intracelulares capazes de hidrolisar os sacarídeos. MURAMATSU *et alii* (1992 e 1993) verificaram que algumas linhagens de bifidobactérias de

excremento humano de adultos utilizaram frutooligossacarídeos e produziram enzimas que clivaram 1-kestose mais rapidamente do que a sacarose. As β -frutofuranosidases de microrganismos são classificadas em dois tipos de enzimas: a primeira, denominada de invertase, que hidrolisa sacarose, mas não a inulina, e, a segunda é uma exo-inulinase (β -frutosidase) que hidrolisa tanto a sacarose quanto à inulina, sendo a proporção de atividade, para inulina e sacarose, variável. ONODERA & SHIOMI (1992) demonstraram que a exo-inulinase de *Penicillium trzebinskii* hidrolisa não somente inulina e sacarose, mas, também, inulo oligossacarídeos e frutooligossacarídeos.

ZIESENITZ & SIEBERT (1987) observaram que, em virtude de a nistose não ser completamente clivada no intestino delgado, mas ser rapidamente convertida a ácidos pelas bactérias do ceco, seu valor energético para o hospedeiro seria certamente menor do que um tetrassacarídeo que fosse completamente digerido e absorvido no intestino delgado. Uma substância que passa pelo intestino delgado sem ser hidrolisada, mas é fermentada pela flora do ceco e cólon, é uma provável candidata à laxante, por razões osmóticas; portanto, a utilização da nistose como substituto da sacarose, vem sendo sugerida, uma vez que não produz glicose ou frutose para o organismo, sendo um adoçante potencial nas dietas para pacientes diabéticos. Também, a fermentação anaeróbica de nistose por microrganismos da placa dental e *Streptococcus mutans* NCTC 10449 foi cerca de 50% menos rápida do que com a sacarose.

Experimentos “in vitro” realizados por TOKUNAGA *et alii*, (1989) demonstraram que o “neosugar” incubado anaerobicamente com a flora do ceco de ratos, metabolizaram cerca de 10% desse açúcar a CO₂, 66% a ácidos graxos voláteis e 7% foram destinados ao crescimento microbiano. MODLER, 1994, salientou que, embora alguns benefícios tenham sido alcançados em testes com animais, os dados são altamente variáveis, requerendo, portanto, maior estudo.

HIDAKA & HIRAYAMA (1991) investigaram a utilização de frutooligossacarídeos, através de estudos em radiorespirômetro e incubação anaeróbica de frutooligossacarídeos [U-¹⁴C] com fezes. Quando sacarídeos

marcados foram ingeridos, cerca de 49% e 55% da radioatividade administrada foi detectada no $^{14}\text{CO}_2$, expirado após 24 e 48 horas, respectivamente, e a taxa máxima de excreção do $^{14}\text{CO}_2$ ocorreu após 7 horas. Na incubação anaeróbica dos frutooligossacarídeos com fezes humanas, os sacarídeos foram catabolizados principalmente a $^{14}\text{CO}_2$ (9,6%) e ácidos graxos de cadeia curta (57,8%). Interpretação complementar desses estudos levaram à elucidação da via catabólica através da qual os $[^{14}\text{C}]$ frutooligossacarídeos foram fermentados pelas bactérias intestinais em $^{14}\text{CO}_2$ e $[^{14}\text{C}]$ ácidos graxos de cadeia curta, os quais foram absorvidos e utilizados pelo homem produzindo $^{14}\text{CO}_2$ respiratório. Todavia, a utilização calórica desses sacarídeos foi quantificada através da estimativa da quantidade de $[^{14}\text{C}]$ ácidos graxos absorvidos pelo cólon, sendo a energia disponível estimada entre 1,5 a 2,0 kcal/g de frutooligossacarídeos.

MODLER (1994) verificou que a adição de "neosugars" à dieta humana (15g/dia), causou um acréscimo de 10 vezes, na população, de bifidobactérias do intestino grosso, bem como a ocorrência de bifidobactérias de 87% para 100%. Ao mesmo tempo, houve uma redução de 0,3 unidades no pH intestinal e também um decréscimo na contagem de enterobacteriaceae. HIDAKA *et alii* (1986) conduziram estudos semelhantes e observaram um aumento na produção de ácidos graxos voláteis, quando 8 gramas de "neosugar" foram administrados diariamente.

Segundo HIDAKA *et alii* (1986); HIDAKA & HIRAYAMA (1991), a administração de frutooligossacarídeos a pacientes senis, durante duas semanas (8g/dia), resultou num aumento significativo do número de bifidobactérias nas fezes, sem que houvesse uma elevação das bactérias putrefativas. A média do número das bifidobactérias por grama de fezes aumentou cerca de 10 vezes, após 14 dias de administração de frutooligossacarídeos. Esses resultados sugerem que as bifidobactérias utilizam frutooligossacarídeos mais rapidamente que as espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, que são bactérias dominantes no intestino humano ou de outras espécies "in vivo".

MODLER *et alii* (1990b); MODLER, 1994 e HIDAKA & HIRAYAMA (1991) classificaram as bifidobactérias e lactobacilos como bactérias intestinais benéficas, enquanto a *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* foram desfavoráveis para humanos e animais, em termos de saúde e nutrição. Também foi estudada "in vitro" a utilização de diversos açúcares pelas bactérias intestinais de seres humanos, sendo os frutooligossacarídeos considerados fatores de crescimento para os microrganismos da flora intestinal.

HIDAKA & HIRAYAMA (1991) observaram que os frutooligossacarídeos foram utilizados pelas bifidobactérias, com exceção do *Bifidobacterium bifidum*. Comparados com outros açúcares, os frutooligossacarídeos não foram utilizados pelos *Lactobacillus fermentum*, *E. coli* ou *Clostridium perfringens*. Nesse experimento, espécies do grupo *Bacteroides fragilis* utilizaram todos os açúcares analisados.

McKELLAR & MODLER (1989) constataram que as bifidobactérias possuem enzimas hidrolíticas conhecidas como inulinases (2,1- β -D-frutana-frutanolhidrolase), que clivam os frutooligossacarídeos, ao contrário das enzimas digestivas de humanos e animais. As linhagens das bifidobactérias de seres humanos e de animais podem metabolizar prontamente polímeros de cadeia curta (grau de polimerização 3 a 6); contudo, linhagens de bifidobactérias animais metabolizam a inulina mais efetivamente do que as bifidobactérias de origem humana. As diferenças no metabolismo sugerem que a inulina é incapaz de atingir o sítio ativo das enzimas das bifidobactérias humanas, ou então um impedimento estérico poderia estar envolvido. Estudos "in vitro" demonstraram que o *B. longum* tem dificuldade de metabolizar polímeros de cadeia longa, tais como a inulina. *B. adolescentis* metabolizaram inulina de forma mais eficaz do que *B. longum*, mas o *B. thermophilum* apresentou melhor crescimento e atividade de inulase. *B. infantis* utilizaram cadeias curtas de frutooligossacarídeos, porém, foram incapazes de metabolizar polímeros de cadeias longa (grau de polimerização maior que 25).

Estudos conduzidos por VRIES *et alii* (1967) demonstraram que o *Bifidobacterium bifidum*, um anaeróbico, encontrado na flora intestinal de seres humanos, fermentou a glicose a aproximadamente 1,5 mol de acetato e 1 mol de lactato, mas não hidrolisou frutooligossacarídeos.

HIDAKA *et alii* (1986) observaram que o *B. bifidum* não cresceu em meio suplementado com frutooligossacarídeos de cadeia curta (neosugar). *B. longum* cresceu muito pouco, enquanto *B. adolescentis* e *B. infantis* metabolizaram prontamente este carboidrato. *E. coli* e espécies de *Clostridium* não cresceram bem em meios com frutooligossacarídeos (neosugars).

Conclui-se, portanto, que a maioria das linhagens de bifidobactérias de origem humana e animal metabolizam fatores bifidogênicos, dentre os quais os frutooligossacarídeos. Geralmente, frutooligossacarídeos de cadeia curta (neosugars) são metabolizados mais rapidamente por seres humanos do que os frutooligossacarídeos de cadeia longa, tais como inulina (MODLER, 1994).

2.3. SUPLEMENTAÇÃO DE FATORES BIFIDOGÊNICOS NA DIETA

Segundo MODLER (1994), as bifidobactérias são os microrganismos predominantes da flora intestinal de crianças, estabelecendo-se no trato gastrintestinal, logo após o nascimento. Sua proliferação é estimulada por componentes glicoproteicos da k-caseína do colostro humano e, em menor grau, do leite materno. Frações correspondentes no leite bovino parecem não exercer nenhum efeito estimulatório no crescimento das bifidobactérias. À medida que os seres humanos envelhecem, tanto as espécies quanto o número das bifidobactérias que habitam o trato intestinal, se modificam: as bifidobactérias declinam do primeiro para o terceiro ou quarto maior grupo de microrganismos da flora intestinal; *B. infantis* e *B. breve* são substituídos pelo *B. adolescentis*,

enquanto *B. longum* persiste por toda a vida. Esta alteração, no perfil, pode estar ligada à ingestão na dieta de fatores bifidogênicos.

Também, MODLER (1994) relatou que a maioria das dietas em animais e humanos parece ser deficiente em fatores bifidogênicos, mas, suplementos comerciais, tais como: frutooligossacarídeos e lactulose estão agora disponíveis. Frutooligossacarídeos de cadeia curta, comumente referidos como neosugars, com grau de polimerização menor que 6 são metabolizados em velocidade mais reduzida que a lactulose, pelas bifidobactérias, mas, estes açúcares têm a vantagem sobre a lactulose, uma vez que clostrídios e *E.coli* não crescem, ou se desenvolvem lentamente em frutooligossacarídeos. A aplicação de fatores bifidogênicos, na alimentação animal, é menos problemática do que na humana, pois as linhagens de bifidobactérias de origem animal podem metabolizar cadeias longas de frutooligossacarídeos (grau de polimerização maior que 6), comparadas às linhagens de origem humana.

A adição de fatores bifidogênicos na dieta humana, usualmente resulta num aumento na ocorrência e no número de bifidobactérias, isoladas do material fecal, sugerindo que a suplementação na dieta deveria ser implementada; contudo, evidências mais definidas da eficácia desses compostos são requeridas. As bifidobactérias são hospedeiros específicos e há necessidade de suplementar dietas com substâncias bifidogênicas que possam ser facilmente metabolizadas pelos organismos desejáveis, sem promover o crescimento de bactérias patogênicas, putrefativas ou organismos que causam a produção excessiva de gás. Idealmente, a dieta deveria conter fatores bifidogênicos para estimular o crescimento de bifidobactérias que são naturais ao hospedeiro. O consumo médio de inulina na dieta européia, varia de 2 a 12 g/dia, com um consumo per capita de 5-8 g/dia, na Bélgica e 7-12 g/dia, na Espanha (MODLER, 1994).

Segundo STONE-DORSHOW & LEVITT (1987), durante os últimos dez anos, um esforço concentrado vem sendo feito para desenvolver e avaliar os efeitos dos vários ajustes na dieta, na saúde humana e na população de bifidobactérias; contudo, o progresso tem sido muito lento. Frutooligossacarídeos

e lactulose são comercialmente disponíveis e largamente utilizados na Europa e Japão como fatores bifidogênicos. Estes compostos são seguros sob o ponto de vista toxicológico e apresentam alguns efeitos positivos, mas não são, necessariamente, os fatores de crescimento ideal para as bifidobactérias: ambos os compostos podem ser metabolizados por outras bactérias que são capazes de produzir gás e isto pode causar desconforto intestinal.

Dados com relação à produção e consumo de fatores bifidogênicos comerciais são limitados. TOMOMATSU (1994) projetou que o mercado de alimentos funcionais atingiria o valor de US\$4.5 bilhões, com um crescimento anual de 8% para 1995. Os oligossacarídeos são um dos mais populares alimentos funcionais no Japão, mas, são relativamente desconhecidos nos Estados Unidos. Os japoneses produziram 40 milhões libras (US\$46 milhões) de nove diferentes tipos de oligossacarídeos em 1990. O número de produtos consumidos, contendo oligossacarídeos, atingiu 450, em 1991, incluindo refrigerantes, biscoitos, cereais e doces. A incorporação de bifidobactéria, em vez de oligossacarídeos, em alimentos processados, é muito difícil, devido a sua alta suscetibilidade ao oxigênio, calor e ácidos.

A literatura destaca uma melhora na performance geral de animais alimentados com fatores bifidogênicos, porém, esses resultados não são muito claros e altamente variáveis. Há duas principais áreas de aplicação de fatores bifidogênicos em animais: como substituto do leite (bezerro, ovelha, porco), e na suplementação de rações avícolas. As linhagens de bifidobactéria, tais como *B. thermophilum*, podem metabolizar frutanas de cadeia curta ou longa, porém, frutanas de cadeia longa são mais adequadas em termos de uma limitada produção de gás, aliviando, portanto, o desconforto intestinal (MODLER, 1994).

HIDAKA *et alii* (1986) estipularam que a quantidade eficaz de frutooligossacarídeos necessária para adultos é de cerca de 5 g/dia, portanto, a adição desses açúcares em alimentos consumidos diariamente, como os produtos de panificação, poderia ser efetiva.

Segundo ODA & OUCHI (1991), leveduras comerciais de panificação hidrolisam frutooligossacarídeos através da ação da invertase, fermentando os monossacarídeos resultantes. Uma alternativa seria construir uma levedura que fermentasse a sacarose, sem decompor os frutooligossacarídeos, de modo a se obterem massas contendo frutooligossacarídeos.

MODLER *et alii* (1990a) adicionaram em sorvetes uma mistura constituída de três *Bifidobacterium sp* (*B. longum*, *B. brevis* e *B. infantis*) e dois tipos de fatores bifidogênicos: neosugars e farinha de alcachofra-de-jerusalém. Fez-se um monitoramento das bactérias sobreviventes por um período de 70 dias. Aproximadamente 90% de todas as espécies bacterianas sobreviveram após 70 dias, nos produtos armazenados a -17°C. A presença de fatores bifidogênicos (1% de neosugar e 2% de farinha de alcachofra-de-jerusalém) não causaram nenhum efeito deletério na contagem bacteriana. A perda de 10% ocorreu, primeiramente, durante o congelamento e parece estar relacionada à incorporação de oxigênio. A farinha de alcachofra-de-jerusalém foi considerada uma fonte inaceitável de fatores bifidogênicos, devido ao seu flavor e aparência desagradáveis. O produto contendo neosugar foi similar ao controle em relação às características sensoriais avaliadas. Níveis mais elevados de neosugar (2%) produziram um produto que era levemente mais cremoso que o controle ou tratamentos contendo 0,5 a 1,0% de neosugar. Além disso, o neosugar não apresentou nenhum efeito adverso, nas características físicas do sorvete.

2.4. EFEITOS BENÉFICOS DA INGESTÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A administração endovenosa de frutooligossacarídeos em ratos, resultou na excreção rápida e de forma intacta deste açúcar, sugerindo que não são utilizados totalmente como fonte de energia. É possível que a ingestão de frutooligossacarídeos promova a sua metabolização pela microflora intestinal. Os

frutooligossacarídeos agiriam como fonte de carboidrato para a flora intestinal, tendo-se observado que 65% dos frutooligossacarídeos são convertidos em ácidos graxos voláteis, o que equivaleria a 1,5 kcal/g de frutooligossacarídeo, produzindo ácidos graxos voláteis que são absorvidos pela mucosa do ceco e cólon, e metabolizados para produzir energia ao hospedeiro. Os frutooligossacarídeos parecem possuir uma função semelhante às fibras na dieta, pois aumentam o bolo fecal, reduzem o trânsito gastrointestinal, aumentam o volume no lúmen intestinal e podem suprimir a digestão e absorção de nutrientes no intestino, além de exercerem um efeito modulador da flora intestinal (OKU *et alii*, 1984; TOKUNAGA *et alii*, 1986 e 1989; McKELLAR & MODLER, 1989; MODLER *et alii*, 1990b; SPIEGEL *et alii*, 1994; MODLER, 1994).

Os frutooligossacarídeos têm sido recomendados como fatores bifidogênicos. A adição desses açúcares, na dieta humana, aumentou a população das bifidobactérias no intestino grosso, tendo-se verificado um acréscimo de dez vezes, após a ingestão de 8 g/dia de frutooligossacarídeos. Poucas informações são disponíveis com relação aos efeitos fisiológicos dos fatores bifidogênicos em seres humanos, mas foi demonstrada uma redução nos níveis de colesterol, triglicerídeos, glicose, ácidos graxos livres e pressão sanguínea de pacientes alimentados com 22,5 g de frutooligossacarídeos por dia (YAMASHITA *et alii*, 1984 e MODLER *et alii*, 1990b; MODLER, 1994).

As bifidobactérias exercem um importante papel no controle do pH intestinal, através da liberação dos ácidos láctico e acético. Estes ácidos são produzidos na proporção molar de 3:2, respectivamente, reduzindo o pH intestinal e, conseqüentemente, restringindo o crescimento de bactérias patogênicas e putrefativas. Através do controle do pH intestinal, é possível limitar a produção de substâncias nocivas, tais como: fenóis, aminas vasoconstritoras (histamina, tiramina, cadaverina e agmatina), p-cresol, amônia, indol, escatol, metabólitos derivados de esteróides e toxinas bacterianas. (HIDAKA *et alii*, 1986; MODLER *et alii*, 1990a,b; MURAMATSU *et alii*, 1992, 1993; MODLER, 1994).

Com relação ao efeito inibitório das bifidobactérias sobre outras bactérias, principalmente patogênicas, tem sido sugerido que o mecanismo de inibição exercido pelas bifidobactérias estaria relacionado somente à produção fermentativa de ácidos (lactato e acetato). Porém, experimentos conduzidos por GIBSON & WANG (1994b), indicaram que as bifidobactérias eram capazes de inibir o crescimento de bactérias patógenas através da excreção de substâncias anti-microbianas, com largo espectro de ação. Espécies pertencentes ao gênero *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* e *Vibrio cholerae* foram afetadas por essas substâncias bacteriostáticas ou bactericidas, demonstrando que as bifidobactérias são capazes de exercer mais de um mecanismo de inibição.

Segundo TOMOMATSU (1994), os efeitos benéficos à saúde, pela ingestão de frutooligossacarídeos, assemelham-se àqueles atribuídos à fibra, na dieta. Contudo, os frutooligossacarídeos não possuem os efeitos físicos da fibra, tais como: aumento na viscosidade, ligação com a água e efeitos espessantes. A contribuição dos frutooligossacarídeos à saúde é devida, principalmente, às suas características fermentativas (fator de crescimento das bifidobactérias). As fibras, especialmente as solúveis em água, parecem, também, contribuir para a saúde humana, através da fermentação. Contudo, até o presente, a falta de estudos detalhados sobre a fermentação das fibras torna difícil a comparação com os frutooligossacarídeos, como fator de crescimento das bifidobactérias. As vantagens dos frutooligossacarídeos sobre as fibras são: menor requerimento diário de frutooligossacarídeos (3g/dia); não causam diarreia nas doses recomendadas; são levemente adocicadas, apresentam textura e sabor razoáveis, são totalmente solúveis em água, não são viscosos, não se ligam a minerais, são estáveis e mais fáceis de serem incorporados em bebidas e alimentos processados. Algumas publicações relatam os efeitos anticancerígenos das bifidobactérias em testes com pequenos animais. Estes efeitos anticânceres são devidos ao aumento na imunidade causada pelos componentes da parede celular e componentes extracelulares das bifidobactérias.

A dose efetiva diária de frutooligossacarídeo (forma pura) é de 3,0 g, sendo a dose mínima requerida de frutooligossacarídeo para induzir diarreia, de 44g para o homem e 49 g para mulher (SPIEGEL *et alii*, 1994).

Os frutooligossacarídeos não são metabolizados pela maioria da flora microbiana oral, especialmente pelo *Streptococcus mutans*; não sendo utilizados como substrato para a produção de ácido láctico, resultando, portanto, em baixa propriedade cariogênica (ZIESENITZ & SIEBERT, 1987; MODLER *et alii*, 1990b).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. EQUIPAMENTOS

- Liofilizador Labconco Lyph.Lock 18 litros
- Sonicador (Labsonic Systems)
- Cromatógrafo líquido, modelo CG 480, acoplado a um detector refratométrico IR-CG-410
- Sistema de ultrafiltração em membrana, modelo TCF2A (Amicon Co.)
- Balança analítica Mettler H10
- Balança eletrônica digital ACATEC BEC 1000
- Medidor de pH Digimed DMPH-2
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J2-21
- Espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70
- Incubadora com sistema de agitação série G 25 (New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.)
- Banhos de água calibrados de 35°C a 75°C (Sarge).
- Estufa calibrada a 100°C
- Estufa bacteriológica Fanem
- Câmara de fluxo laminar
- Coletor de frações Foxy 200 - Isco.

3.1.2. REAGENTES E MATERIAIS ESPECÍFICOS

Açúcares:

Glicose, Frutose, Sacarose, Glicerol e Eritritol (Merck ou Ecibra)
1-Kestose (GF₂), Nistose (GF₃), β -Frutofuranosil nistose (GF₄), 6-Kestose e Neokestose (Daiichi Chemical Co. Tokyo, Japan).

Meios de Cultura:

Sacarose-agar (20% sacarose; 1% extrato de levedura; e 2% ágar).
Sacarose (10% sacarose; 0,5% extrato de levedura; 0,1% de uréia).
PDA (agar-batata-dextrose)
YM (0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose e 2% ágar).

Reagentes Químicos:

Ácido bórico, acetato de etila, álcool isopropílico, difenilamina, acetona, anilina, ácido ortofosfórico a 85%, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, ácido cítrico, fosfato de sódio bibásico, glicina, borax, tris (hidroximetil) aminometano, n-bromosuccinimida, arseniato, p-cloromercuribenzoato, dietilditiocarbamato de sódio, cisteína, oxalato de sódio, bissulfito de sódio, azida sódica, ácido etilenodiaminotetracético, p-hidroximercuribenzoato, iodo, cloreto mercúrico, nitrato de prata, acetato de chumbo, sulfato de manganês, sulfato férrico, cloreto de bário, cloreto férrico, sulfato de zinco, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de cobalto, cloreto de cálcio, cloreto de alumínio, iodoacetamida (Reagen, Merck ou Ecibra)

Kit glicose-oxidase/peroxidase (CELM)

Resinas:

DEAE-Sephadex A-50

CM-Sephadex C-50

Sephadex G-200

Outros Materiais:

Papel Whatman n.º 1 (46 x 57 cm)

Filtros Millipore 0,45 µm

Membrana de ultrafiltração Diaflo YM10 - Amicon

3.2. MÉTODOS:

3.2.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS OSMOFÍLICOS DE AMOSTRAS DE VEGETAIS, SOLO E MEL

Amostras de solo, folhas, pólen de flores, caule de vegetais, favos de mel e mel provenientes dos Estados do Amazonas, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foram coletadas em tubos de polietileno com capacidade para 1,8 ml, contendo 1 ml de meio de enriquecimento constituído de 40% de sacarose e 1% de extrato de levedura.

Utilizando-se metodologia descrita por HAJNY *et alii* (1960 e 1964), transferiram-se as culturas contidas nos tubos de polietileno para frascos Erlenmeyers de 50 ml, contendo 10 ml de meio de cultura, composto de 40% de sacarose e 1% de extrato de levedura. Incubou-se em agitador rotatório a 200 r.p.m., 30°C por 72 horas. Posteriormente, inocularam-se as respectivas culturas em placas de Petri contendo 20% de sacarose, 1% de extrato de levedura e 2% de agar. Deixou-se em estufa a 30°C durante 3 dias. As colônias isoladas foram em

seguida repicadas em agar inclinado de mesma composição, incubadas a 30°C e depois mantidas a 5°C.

3.2.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β -FRUTOFURANOSIDASE

Cada linhagem isolada, conforme item 3.2.1., foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 50 ml, contendo 10 ml de meio de cultura, constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Incubou-se em agitador rotatório a 200 r.p.m., 30°C, por 72 horas (PARK *et alii*, 1993). Após esse período, centrifugou-se o meio fermentado a 11.000 x g., 4°C por 10 minutos para obtenção do sobrenadante e massa celular. Tanto o sobrenadante (enzima extracelular) quanto a massa celular (enzima intracelular) foram analisados qualitativamente para a produção de frutooligossacarídeos, através da cromatografia descendente em papel, de acordo com o item 3.2.5.1.

3.2.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE β -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA

As linhagens n.º 7, 79, 372-1, 377-1, 379, 675-5, 771-1, 771-2 que apresentaram alta atividade de transferência, foram cultivadas em placas de Petri contendo agar-sacarose (20% de sacarose, 1% de extrato de levedura e 2% de agar), agar batata dextrose e agar YM (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de malte, 0,5% de peptona, 1% de glicose e 2% de agar) a 25°C. As colônias isoladas foram transferidas para tubos inclinados contendo os respectivos meios de

cultura e os tubos incubados a 25°C. A morfologia e coloração das colônias foram observadas diariamente durante 10 dias (CHO *et alii*, 1990b).

A formação de esporos e conídios foi verificada após cultura das linhagens em meio líquido constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.

3.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE

O sobrenadante e a massa celular foram utilizados como fonte de enzima extracelular e intracelular, respectivamente. Para extração da enzima intracelular, a massa celular foi submetida a ultrasonicação a 150 watts durante 4 minutos e em seguida centrifugada a 11.000 x g a 4°C, durante 10 minutos, sendo este sobrenadante utilizado como β -frutofuranosidase intracelular. A atividade enzimática foi determinada incubando-se a 55°C por 60 minutos, 0,9 ml de solução de sacarose 10% (p/v) dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5 e 0,1 ml da preparação enzimática. A reação enzimática foi interrompida através de fervura em água por 10 minutos.

A concentração de glicose foi determinada através do método da glicose-oxidase/peroxidase (Kit CELM).

Uma unidade de atividade da β -frutofuranosidase (atividade de transfrutossilação) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de glicose/minuto/ml (JUNG *et alii*, 1987 e 1989; PARK & ALMEIDA, 1991).

Alternativamente, glicose, frutose e 1-kestose foram determinados através de CLAE (item 3.2.5.2).

Uma unidade de atividade hidrolítica da β -frutofuranosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de frutose/minuto/ml (PARK & ALMEIDA, 1991).

3.2.5. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

As análises qualitativa e quantitativa de açúcares foram realizadas através da cromatografia em papel e da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente.

3.2.5.1. CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Em papel Whatman n.º1 (46 x 14 cm), tratado previamente com solução de ácido bórico 0,25 M, foram aplicados, respectivamente, 1 μ l do sobrenadante e da mistura de reação constituída da suspensão celular de cada linhagem isolada e do substrato sacarose, para verificação da produção de frutooligossacarídeos, tendo-se como padrões 1 μ l das soluções de sacarose, frutose, glicose a 10% e 10 μ l da solução 1% de 1-kestose, nistose e β -frutofuranosil nistose.

A cromatografia descendente em papel foi desenvolvida por 15 horas, utilizando-se como sistema de solvente acetato de etila, álcool isopropílico e água na proporção 6:3:1 (v/v). O cromatograma foi revelado com reagente difenilamina-anilina-ácido fosfórico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C (LUND & WYATT, 1973).

Para determinação de polióis utilizou-se papel Whatman n.º 1 (46 cm x 14 cm), sem tratamento com ácido bórico, onde foram aplicados 1 μ l do sobrenadante e do sistema de reação constituído da suspensão celular de cada linhagem

previamente isolada e do substrato sacarose, tendo-se como padrões 1 µl das soluções de sacarose, frutose, glicose a 10% e 10 µl das soluções 1% de eritritol e glicerol. O sistema de solvente utilizado foi acetato de etila-álcool isopropílico-água (6:3:1, v/v) durante 12 horas. Os açúcares foram detectados através de revelação em solução de nitrato de prata saturada, NaOH 0,5 N alcoólico e tiosulfato de sódio 10% (TREVELYAN *et alii*, 1950).

3.2.5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise quantitativa de açúcares foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HIDAKA *et alii*, 1988; JUNG *et alii*, 1989), em cromatógrafo CG 480 C, acoplado a um detector refratométrico diferencial IR-CG-410 e coluna shodex ionpak KS-802, nas seguintes condições: fluxo de 1 ml/min; pressão de 22 kg/cm² a temperatura de 50°C, utilizando-se água como eluente e tendo-se como padrões: frutose, glicose, sacarose, 1-kestose, nistose, β-frutofuranosil nistose, 6-kestose, neokestose. Amostras e padrões antes de serem injetados no cromatógrafo, foram filtrados em membrana millipore de éster de celulose, com porosidade de 0,45 µm.

3.2.6. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO DO *Aureobasidium* sp 771-1, PRODUÇÃO DA β-FRUTOFURANOSIDASE E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Aliquota de 1 ml da suspensão homogênea (10⁷/ml) da cultura de *Aureobasidium* sp 771-1, isolada conforme itens 3.2.1 e 3.2.2. e que apresentou

maior atividade de transfrutossilacção em relação as oito linhagens selecionadas foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de meio de cultura, composto de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 r.p.m. a 30°C (PARK *et alii*, 1993).

Em intervalos regulares de tempo, durante um período de, aproximadamente, 70 horas, foram retiradas amostras do meio fermentado para determinação do pH, atividade da β -frutofuranosidase extracelular e intracelular e crescimento da massa celular.

Para determinação do crescimento celular e da atividade enzimática, as células precipitadas foram ressuspensas em água deionizada e centrifugadas por três vezes a 11.000 x g, 4°C, durante 10 minutos, ajustando-se a quantidade de água adicionada ao volume original do meio, sendo o crescimento celular estimado pela medida da absorbância da suspensão celular a 660 nm (MALLETE, 1969). A atividade da β -frutofuranosidase no sobrenadante do meio (extracelular) e na massa celular (intracelular) foi determinada de acordo com o item 3.2.4.

3.2.7. PREPARAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA A PARTIR DE *Aureobasidium* sp 771-1

Um ml da suspensão celular da linhagem n.º 771-1 (10^7 /ml) foi inoculada em 80 frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório a 200 r.p.m., temperatura de 30°C por 72 horas. Após esse período, o meio foi centrifugado a 4°C, 11.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi dialisado em água deionizada por 48 horas e em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5, sendo em seguida concentrado através da ultrafiltração em membrana de 10.000 Da.

Posteriormente, foi liofilizado e utilizado como fonte extracelular de β -frutofuranosidase bruta. A massa celular, correspondente a 131 g e proveniente da fermentação de 3900 ml de meio, foi lavada 3 vezes em água deionizada, centrifugada, resuspensa em 20 ml de tampão citrato-fosfato, 0,1M, pH 5,5 e submetida a ultrasonicação a 150 watts durante 4 minutos. Em seguida foi centrifugada a 4°C, 11.000 x g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado e utilizado como fonte intracelular de enzima.

Escolheu-se para este experimento, a β -frutofuranosidase extracelular como fonte de enzima, por haver apresentado maior atividade de transfrutossilação.

3.2.8. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O estudo das características bioquímicas da β -frutofuranosidase bruta de *Aureobasidium sp* 771-1 em relação ao seu pH, temperatura ótima de atividade e estabilidade foram realizados com o concentrado extracelular bruto da enzima obtido de acordo com o item 3.2.7.

3.2.8.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da β -frutofuranosidase extracelular bruta, obtida de acordo com o item 3.2.7. e 0,9 ml de solução de sacarose a 10% em diferentes tampões. Foram

usados os sistemas tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 2,6 a 7,0); tampão tris (pH 7,2 a 9,0); tampão ácido bórico-borax 0,1 M (pH 8,7 a 9,2); tampão glicina-NaOH 0,1 M (pH 9,6 e 10). As misturas de reação foram incubadas a 55°C durante 60 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.2.4.

3.2.8.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática, a β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp* 771-1 foi pré-incubada em soluções tampão 0,1 M, em diferentes valores de pH (2,6 a 10), durante 3 horas a 55°C (HAYASHI *et alii*, 1992a,d,f; 1994a; CHANG *et alii*, 1994). Foram utilizados os sistemas tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 2,6 a 7,0); tampão tris 0,1M (pH 7,2 a 9,0); ácido bórico-borax 0,1M (pH 8,7 a 9,2) e glicina-NaOH 0,1M (pH 9,6 e 10). A atividade residual foi determinada conforme item 3.2.4.

3.2.8.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp.* 771-1, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da β -frutofuranosidase extracelular bruta, obtida conforme o item 3.2.7. e 0,9 ml de solução de sacarose a 10% em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5. Os tubos de ensaio, contendo a mistura da reação, foram incubados a 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C durante 1 hora, sendo a atividade enzimática determinada de acordo com o item 3.2.4.

3.2.8.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade enzimática da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1, alíquotas da β -frutofuranosidase extracelular bruta, obtidas de acordo com item 3.2.7., foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e pré-incubados a 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C durante 30 minutos (FUJITA *et alii*, 1990b e CHANG *et alii*, 1994). A atividade residual foi determinada conforme item 3.2.4.

3.2.9. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR DE *Aureobasidium sp* 771-1

A β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp* 771-1, obtida conforme item 3.2.7., foi purificada através de cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose CL-6B e CM-Sepharose CL-6B.

3.2.9.1. PREPARAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR

Para a purificação da β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp* 771-1, uma amostra de 3900 ml de sobrenadante do meio foi concentrada para obtenção de 200 ml da preparação bruta, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.7.

3.2.9.2. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE DE *Aureobasidium* sp 771-1, ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-SEPHAROSE CL-6B

A resina DEAE-Sepharose-CL-6B foi equilibrada em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5 e empacotada em coluna de 40 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro.

O concentrado enzimático, obtido de acordo com o item 3.2.9.1., foi aplicado à coluna de DEAE-Sepharose CL-6B, sendo coletadas frações de 5 ml a cada 30 minutos. Em seguida, a coluna foi eluída com gradiente linear de NaCl, nas concentrações de 0,1 a 1 M no tampão de equilíbrio.

O curso de eluição das proteínas foi acompanhado através da medida da absorbância a 280 nm (WARBURG & CHRISTIAN, 1941), seguido da determinação da atividade da β -frutofuranosidase, de acordo com o item 3.2.4, nas frações que apresentaram picos de absorbância nesse comprimento de onda.

As frações de n.º 15 a 29, contendo maior atividade enzimática, foram reunidas, concentradas através de ultrafiltração e submetidas à diálise contra água deionizada durante 24 horas, sendo, em seguida, equilibradas com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de LOWRY *et alii* (1951) e a atividade da β -frutofuranosidase, conforme item 3.2.4. A preparação da β -frutofuranosidase obtida foi purificada em coluna de CM-Sepharose CL-6B como descrito a seguir.

3.2.9.3. PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR DE *Aureobasidium* sp. 771-1, ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE CM-SEPHAROSE CL-6B

Uma amostra de 120 ml de β -frutofuranosidase contendo 6205 unidades de atividade, obtida de acordo com o item 3.2.9.2, foi aplicada em coluna de CM-Sepharose CL-6B, de 40 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. Frações de 5 ml foram coletadas a cada 30 minutos. A coluna foi posteriormente eluída em gradiente linear de NaCl de 0,1 a 1M no tampão de equilíbrio.

A eluição das proteínas foi monitorada espectrometricamente, através da absorbância a 280 nm (WARBURG & CHRISTIAN, 1941) e a atividade da β -frutofuranosidase foi determinada conforme item 3.2.4, nas frações que apresentaram picos de absorbância nesse comprimento de onda.

As frações n.º 12 a 26, eluídas da coluna e com maior atividade enzimática, foram concentradas e dialisadas contra água deionizada por 24 horas, sendo, posteriormente, equilibradas em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. Em seguida, foram determinados o teor de proteína pelo método de LOWRY *et alii* (1951) e a atividade da β -frutofuranosidase (item 3.2.4).

3.2.9.4. OBTENÇÃO DA ENZIMA PURIFICADA

O eluato obtido conforme item 3.2.9.3., correspondente a um volume de 90 ml, foi concentrado por ultrafiltração em membrana de 10.000 daltons a um volume final de 5 ml, sendo posteriormente liofilizado.

3.2.10. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O estudo das características bioquímicas da β-frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1 com relação ao seu pH, temperatura ótima de atividade, pH, temperatura de estabilidade, peso molecular, efeito de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} , foi realizado com o concentrado enzimático purificado, contendo 19,2 unidades de atividade/ml.

3.2.10.1. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE DA β-FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

Para o estudo do efeito do pH na atividade da β-frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 07, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da β-frutofuranosidase extracelular purificada, obtida de acordo com o item 3.2.9.4 e 0,9 ml da solução de sacarose 10%, em tampão citrato-fosfato 0,1 M na faixa de pH 2,6 a 10. Foram usados os sistemas tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 2,6 a 7,0); tampão tris 0,1M (pH 7,2 a 9,0); tampão ácido bórico-borax 0,1M (pH 8,7 a 9,2); tampão glicina-NaOH 0,1M (pH 9,6 e 10). Os tubos de ensaio, contendo as misturas de reação, foram incubados a 55°C, durante 60 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.2.4.

3.2.10.2. DETERMINAÇÃO DO pH DE ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

Para o estudo da influência do pH na estabilidade da enzima, tubos de ensaio com tampa, contendo 19,2 unidades/ml da β -frutofuranosidase purificada, foram pré-incubados em diferentes soluções tampão 0,1 M (pH 2,6 a 10), a 55°C durante 3 horas (HAYASHI *et alii*, 1991c; 1992a,d,f; 1994a; CHANG *et alii*, 1994). Foram utilizados os sistemas tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 7,0); tampão tris (pH 7,2 a 9,0); ácido bórico-borax (pH 8,7 a 9,2) e glicina-NaOH (pH 9,6 e 10). A atividade residual foi determinada conforme item 3.2.4.

3.2.10.3. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, o sistema de reação foi constituído de 0,1 ml da β -frutofuranosidase extracelular purificada, obtida de acordo com o item 3.2.9.4. e 0,9 ml da solução de sacarose 10% em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5.

Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados a 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C durante 1 hora, sendo a atividade enzimática determinada de acordo com o item 3.2.4.

3.2.10.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, alíquotas contendo 19,2 unidades/ml da enzima em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5, obtida de acordo com o item 3.2.9.4., foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e pré-incubados a 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C durante 30 minutos (FUJITA *et alii*, 1990a, b; CHANG *et alii*, 1994).

A atividade residual da β -frutofuranosidase foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.4.

3.2.10.5. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp*. 771-1

A enzima purificada teve seu peso molecular estimado por filtração em coluna de gel Sephadex G-200, de acordo com a metodologia de ANDREWS (1965), utilizando-se as seguintes proteínas como padrões: pepsina, albumina de soro bovino, imunoglobulina, catalase e ferritina de pesos moleculares de 34.700, 66.000, 150.000, 240.000 e 450.000, respectivamente.

Os padrões, juntamente com a enzima purificada, foram aplicados e percolados em coluna Sephadex G-200 (70 cm x 2,5 cm) equilibrada previamente com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0, contendo 0,1 M KCl.

3.2.10.6. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE PURIFICADA

Foi testado o efeito de íons metálicos (Hg^{2+} ; K^+ ; I^- ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Al^{3+} ; Fe^{2+} ; Mn^{2+} ; Zn^{2+} ; Co^{2+} ; Cu^{2+} ; Ag^+ ; Pb^{2+} , Ba^{2+}) e outras substâncias químicas (arseniato, anilina, dietilditiocarbamato de sódio, cisteína, oxalato de sódio, bissulfito de sódio, azida sódica, p-hidroximercuribenzoato, N-bromosuccinimida; EDTA, p-cloromercuribenzoato, iodoacetamida e β -mercaptoetanol) na atividade enzimática da β -frutofuranosidase purificada.

Sistemas de reação constituídos de β -frutofuranosidase purificada, obtida conforme item 3.2.9.4, e soluções de íons e reagentes químicos nas concentrações de 1 e 10 mM, foram incubados a 55°C, durante 30 minutos (FUJITA *et alii*, 1990b; LEE *et alii*, 1992; DUAN *et alii*, 1993). A atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.4.

3.2.10.7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: K_m E V_{max}

O efeito da concentração de sacarose (0,1 a 1M), na atividade da β -frutofuranosidase purificada, foi investigado a 55°C, pH 5,5, conforme item 3.2.4. Os valores de K_m e V_{max} foram determinados utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934).

3.2.11. APLICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

A produção de frutooligossacarídeos foi testada a partir de soluções 30% e 50% de sacarose. O sistema de reação constituído de cerca de 100 unidades de β -frutofuranosidase extracelular purificada e solução 30% ou 50% de sacarose em tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 5,5, perfazendo um volume final de 100 ml, foi incubado a 55°C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. Amostras da mistura enzima/substrato foram retiradas em intervalos regulares de tempo. O curso da reação enzimática foi monitorado através da análise dos açúcares produzidos por CLAE (HIDAKA *et alii*, 1988; HIRAYAMA *et alii*, 1989; FUJITA *et alii*, 1990a; YUN *et alii*, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Foram isoladas 1752 linhagens de microrganismos, principalmente leveduras osmofílicas, produtoras de enzimas que transformam a sacarose em outros açúcares de interesse industrial, conforme metodologia descrita nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

Deste total, 800 linhagens eram provenientes de pólen de flores, 675 de favos de mel e 277 do solo, folhas e caule de vegetais.

4.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β -FRUTOFURANOSIDASE

Dentre as 1752 linhagens de microrganismos isolados, observou-se a predominância de leveduras osmofílicas, tendo-se verificado que 52 linhagens apresentaram β -frutofuranosidase com atividade de transferência, convertendo a sacarose a frutooligossacarídeos, tais como: 1-kestose, nistose, e frutofuranosil nistose, 409 linhagens produziram β -frutofuranosidase com atividade hidrolítica, ou seja, clivaram a sacarose em glicose e frutose e, finalmente, 54 linhagens converteram a sacarose a polióis e outros açúcares, conforme demonstra a Tabela 1.

Dentre as 52 linhagens que produziram β -frutofuranosidase com atividade de transferência, 8 produziram β -frutofuranosidase extracelular e intracelularmente, convertendo a sacarose a frutooligossacarídeos, como ilustra a Tabela 2. As 44 linhagens restantes eram β -frutofuranosidasas ligadas à célula. As linhagens 771-1, 771-2, 372-1, e 7, isoladas de pólen de flores, produziram altos teores de β -frutofuranosidase extracelular.

As linhagens 771-1, 771-2, 372-1, e 7, isoladas de pólen de flores, produziram altos teores de β -frutofuranosidase extracelular.

A linhagem n.º 79 foi a única levedura isolada da folha de uma árvore frutífera do Amazonas, *Anona densicoma*, que, também, era produtora de β -frutofuranosidase extracelular e intracelular (OLIVEIRA & PARK, 1995), quando comparadas às demais linhagens que foram obtidas do pólen de flores.

A linhagem n.º 771-1 produziu altos teores de β -frutofuranosidase extracelular e intracelular, 3,7 e 2,0 unidades, respectivamente, como demonstra a Tabela 2, tendo apresentado maior atividade de transferência de grupos frutossil que de hidrólise (Tabela 3) e maior produção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose dentre as oito linhagens selecionadas, conforme ilustra a Figura 1, através de cromatografia descendente em papel, tendo sido, portanto, escolhida para ser estudada neste experimento, quanto às suas características enzimáticas.

Tabela 1 - Transformação de sacarose a outros açúcares pelos microrganismos isolados

Produtos Obtidos	Pólen	Mel	Folha	Total de microrganismos que transformaram a sacarose
Frutooligossacarídeos: 1-kestose + nistose + 1F- β -frutofuranosil nistose	40	11	1	52
Glicose + Frutose	186	223	-	409
Polióis	10	33	-	43
Outros Açúcares Não Identificados	10	1	-	11

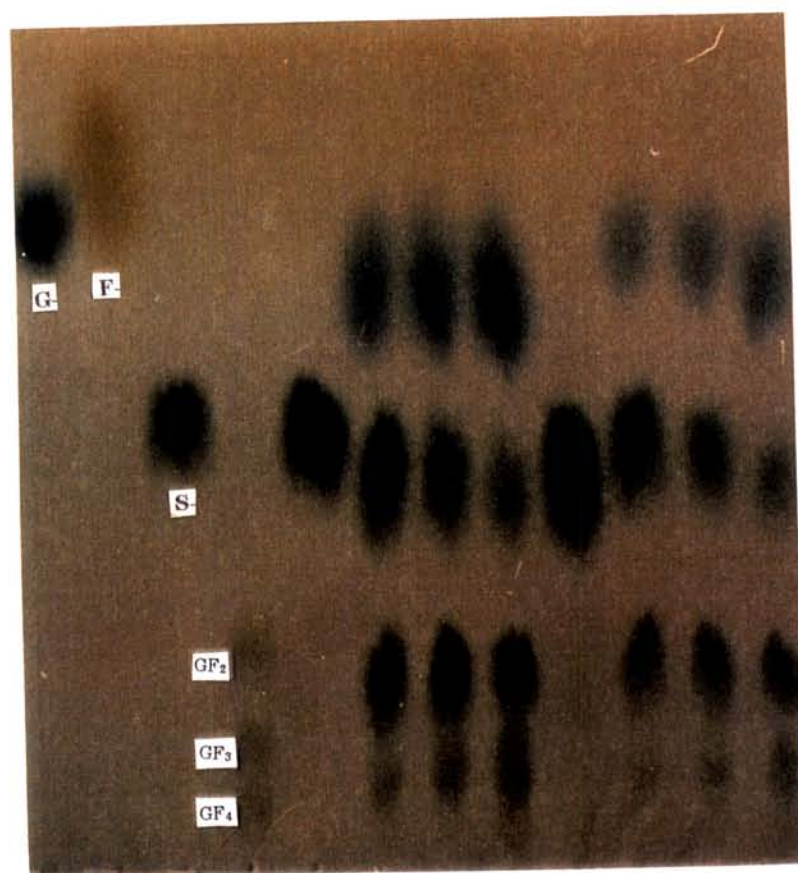
Tabela 2 - Produção da enzima β -frutofuranosidase a partir dos microrganismos isolados

Linhagens	Atividade da β -frutofuranosidase (Unidades)		Fontes de obtenção		
	Extracelular	Intracelular	Mel	Folha	Pólen
379	0,4	0,2			x
377-1	0,4	0,8			x
675-5	0,8	0,04			x
79	1,0	1,0		x	x
7	1,6	0,7			x
372-1	2,0	1,1			x
771-2	3,6	1,1			x
771-1	3,7	2,0			x

Tabela 3 - Atividade de transferência e de hidrólise das β -frutofuranosidases extracelulares de microrganismos isolados

Linhagens	Atividade de transferência (Unidades)	Atividade hidrolítica (Unidades)
379	0,4	0,19
377-1	0,4	0,16
675-5	0,8	0,13
79	1,0	0,07
7	1,6	0,09
372-1	2,0	0,04
771-2	3,6	0,06
771-1	3,7	0,05

G→Glicose
F→Frutose
S→Sacarose
GF ₂ →1-Kestose
GF ₃ →Nistose
GF ₄ →Frutofuranosil nistose



Enzima Extracelular Enzima Intracelular

Figura 1: Transformação da sacarose a frutooligosacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular e intracelular de *Aureobasidium* sp 771-1

4.3. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA LINHAGEM N.º 771-1 PRODUTORA DE β -FRUTOFURANOSIDASE COM ATIVIDADE DE TRANSFERÊNCIA

A linhagem n.º 771-1, produtora de β -frutofuranosidase com alta atividade de transferência, foi isolada do pólen de flores da Bahia.

A linhagem 771-1 apresentou modificação na coloração da colônia com o decorrer da incubação em meios de agar-sacarose, YM e PDA. As Figuras 2, 3 e 4 ilustram que nos três primeiros dias de incubação as colônias apresentaram-se esbranquiçadas, passando a rosada, após 5 a 7 dias e, finalmente, coloração preta, após uma semana de incubação.

A morfologia celular da linhagem n.º 771-1 foi observada após cultivo em meio YM a 25°C, seguida de observação em lâmina no microscópio ótico (450 e 1000 x) como mostram as Figuras 5, 6, 7 e 8.

A Figura 5 demonstra que nos primeiros três dias de incubação, as colônias apresentaram-se na forma de micélio. Após 5 dias, houve a formação de artrosporos como mostra a Figura 6. Com 10 dias de incubação, a maior parte das células passou para o estado de levedura, como ilustra a Figura 7.

Por outro lado, observou-se que, após três dias de incubação em meio líquido constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia, ocorreu a presença de clamidosporos, radulosporos, blastoporos, endosporos e artroconídios, como demonstra a Figura 8.

Com base nesses resultados, a linhagem 771-1 foi identificada como *Aureobasidium sp.* (De Bary), de acordo com a descrição de COOKE (1962).

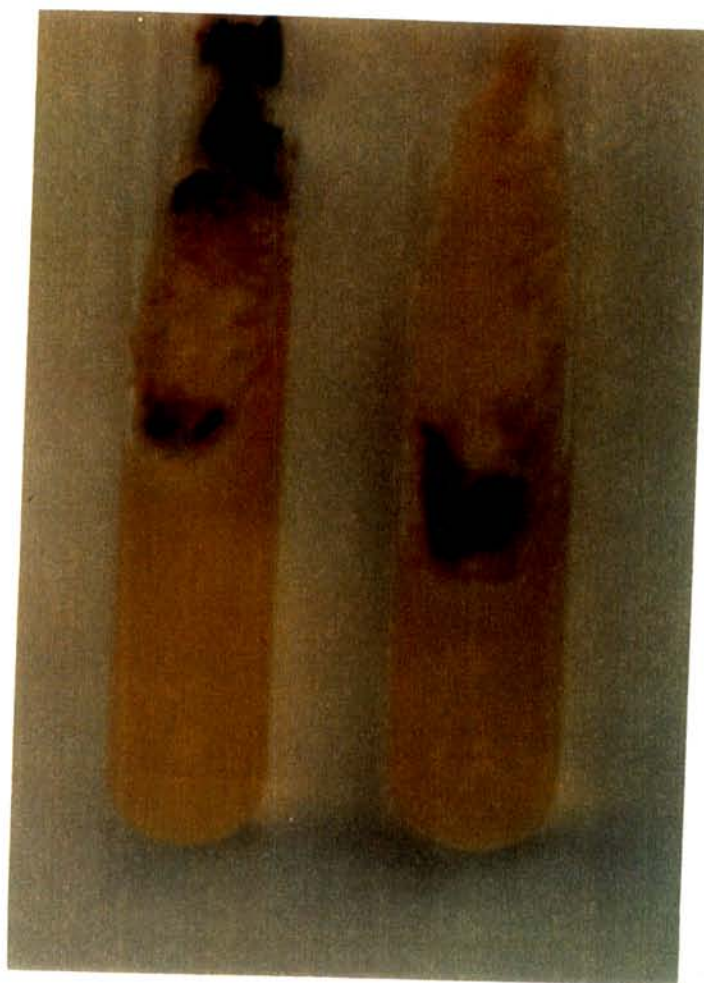


Figura 2: Cultivo de *Aureobasidium sp* 771-1 em meio YM a 25°C

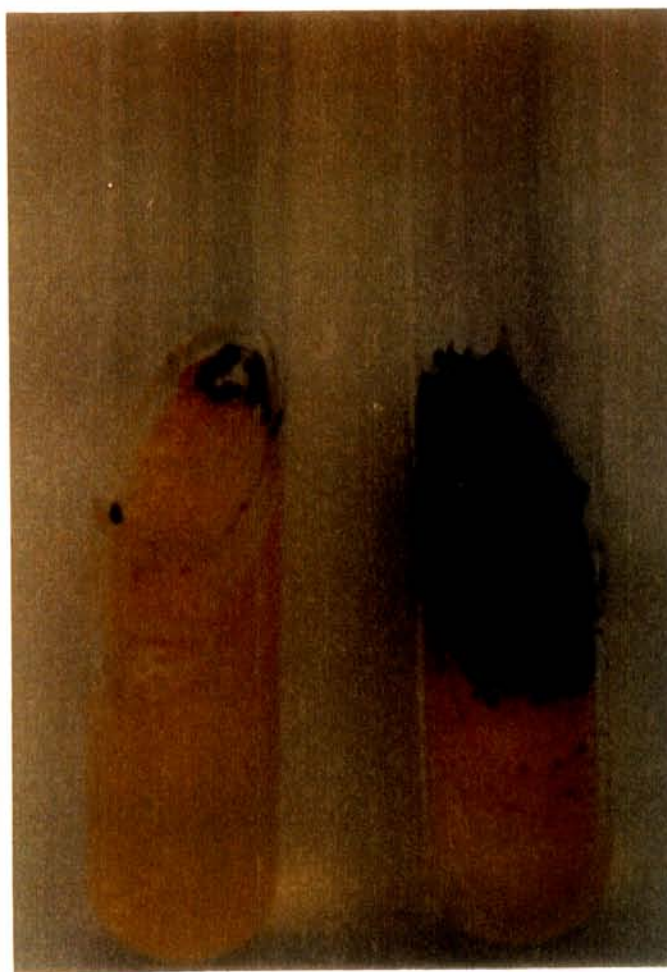


Figura 3: Cultivo de *Aureobasidium sp* 771-1 em meio agar-sacarose a 25°C

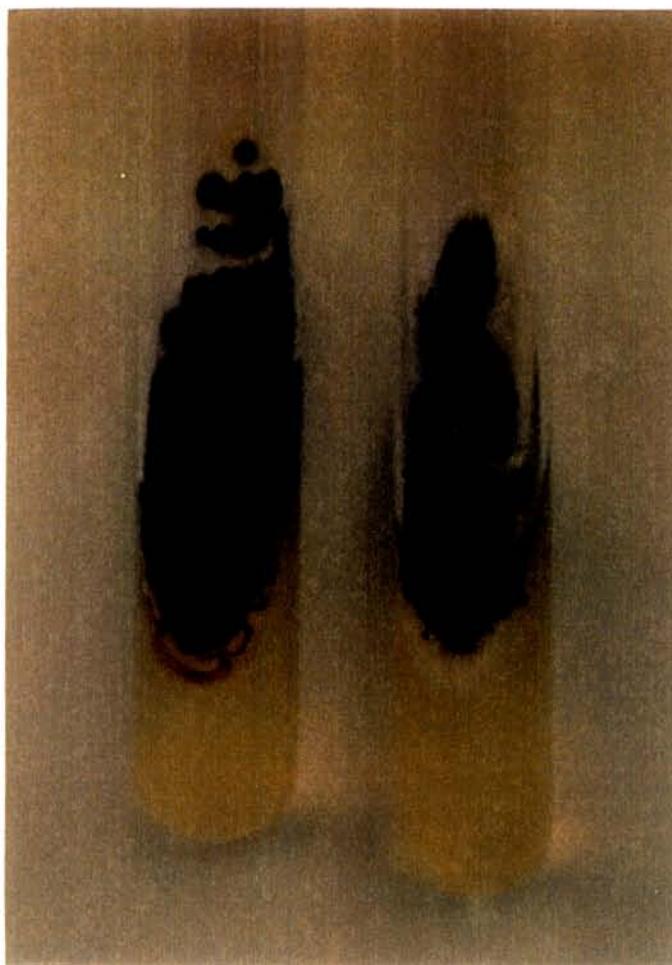


Figura 4: Cultivo de *Aureobasidium sp* 771-1 em meio PDA a 25°C



Figura 5: Características morfológicas do *Aureobasidium sp* 771-1, cultivado em meio YM - 3 dias de incubação (450 X)



Figura 6: Características morfológicas do *Aureobasidium sp* 771-1, cultivado em meio YM - 5 dias de incubação (1000 X)

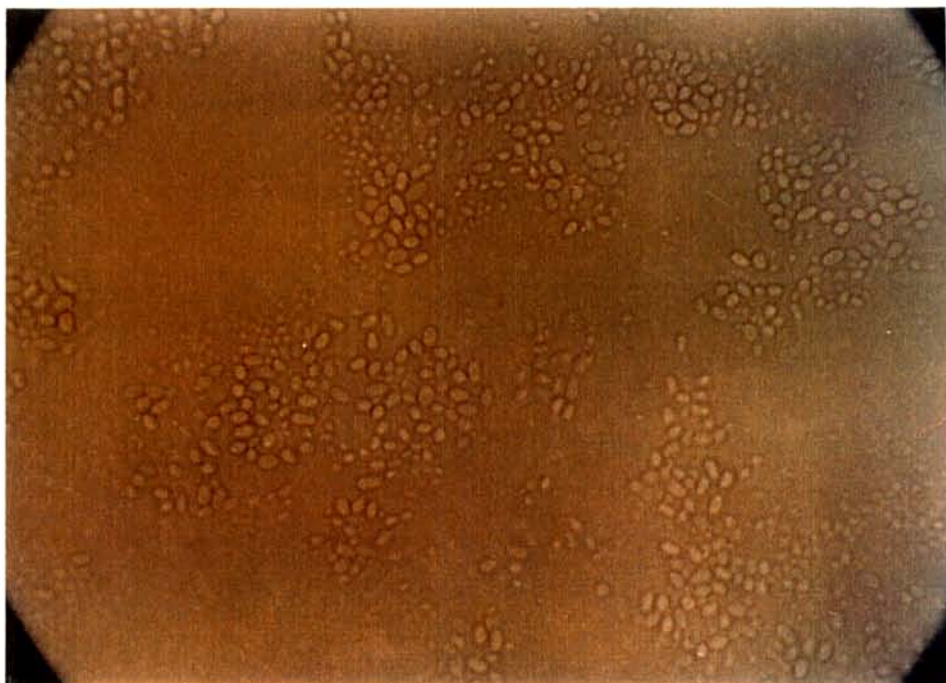


Figura 7: Características morfológicas do *Aureobasidium sp* 771-1, cultivado em meio YM - 10 dias de incubação (1000 X)



Figura 8: Características morfológicas da linhagem de *Aureobasidium sp* 771-1, após cultivo em meio líquido constituído de 10% sacarose, 0,5% extrato de levedura e 0,1% uréia

4.4. RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO CELULAR DO *Aureobasidium* sp 771-1, PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASE E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DURANTE A FERMENTAÇÃO

O estudo da relação entre crescimento celular, produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH do meio, em função do tempo de fermentação, pela linhagem *Aureobasidium* sp 771-1, foi realizada de acordo com o item 3.2.6.

A Figura 9 ilustra esses resultados. Verificou-se que o crescimento microbiano do *Aureobasidium* sp 771-1, bem como a atividade extra e intracelular da β -frutofuranosidase, aumentaram quase linearmente com o tempo, havendo maior produção de β -frutofuranosidase extracelular do que intracelular, atingindo atividades máximas de 9,0 e 4,0 unidades/ml de meio de cultura, respectivamente, com 70 horas de fermentação. HAYASHI *et alii* (1990) relataram que o crescimento celular e a atividade total de transfrutossilacção do *Aureobasidium* sp ATCC 20524, alcançaram seu ápice no terceiro dia de fermentação a 30°C, sob agitação, e que a atividade de transferência de grupos frutossila intracelularmente foi maior no início da fermentação, seguido de um aumento da atividade enzimática extracelular, após o primeiro dia. YUN *et alii* (1990), também, observaram uma elevação na atividade da frutossiltransferase intracelular, bem como da concentração celular de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245, em relação ao tempo de fermentação, por um período de 36 horas em fermentador piloto de 70 litros a 28°C, a 400 rpm. CHO *et alii* (1990a) demonstraram que a concentração de células de *Aureobasidium pullulans* foi crescente até o sétimo dia de incubação a 30°C, sob agitação, havendo um lento decréscimo após esse período. A atividade extracelular da enzima frutossiltransferase aumentou durante 10 dias de fermentação, tendo-se verificado uma similaridade entre as curvas de crescimento celular e de atividade extracelular. A atividade intracelular da frutossiltransferase foi elevada até o sétimo dia de incubação. As atividades extra e intracelular da frutossiltransferase

foram quase idênticas até o terceiro dia, havendo um aumento constante da atividade extracelular até o décimo dia, ao contrário da atividade intracelular que sofreu uma redução após o sétimo dia, tendo os referidos autores especulado sobre uma correlação entre crescimento celular e atividade enzimática e que a frutossiltransferase extracelular era proveniente da frutossiltransferase intracelular.

A Figura 9, também, ilustra um decréscimo no pH do meio que variou de 7,7 a 4,4. Segundo CPC INTERNATIONAL INC. (1982); CHO *et alii* (1990b) e HAYASHI *et alii* (1991d), há variação no pH do meio em função da composição, da concentração dos reagentes químicos que fazem parte de sua formulação e do tempo de fermentação, considerando-se o inóculo de *Aureobasidium*. Nos meios de cultura propostos pelos autores citados, o pH variou, respectivamente, de 6,8 a 4,0 após 32,5 h; de 8 a 6, após 120 h e 7,5 a 6,5 após 10 dias de fermentação.

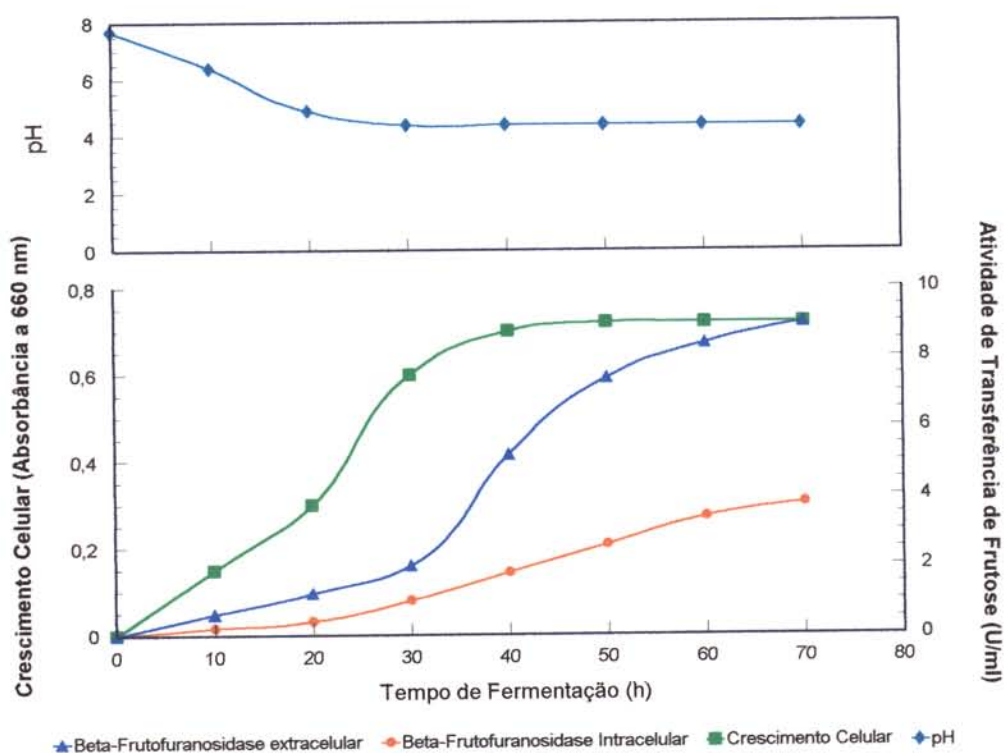


Fig. 9 - Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento celular e produção da β-frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1

4.5. CARACTERIZAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE BRUTA DE *Aureobasidium* sp 771-1

4.5.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE *Aureobasidium* sp 771-1

O efeito do pH na atividade da β -frutofuranosidase extracelular bruta, foi determinado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.8.1. A Figura 10 mostra que a enzima apresentou maior atividade no pH 5,3, em tampão citrato-fosfato 0,1M. Estudos conduzidos por JUNG *et alii* (1989) e HAYASHI *et alii* (1990), utilizando frutossiltransferase extracelular não purificada de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245 e β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium* sp ATCC 20524, respectivamente, demonstraram que o pH ótimo de atividade estava na faixa de 5,0 a 6,0; similar, também, a β -frutofuranosidase bruta de *Aspergillus japonicus* cujo pH ótimo estava entre 5,0 a 5,5 (HAYASHI *et alii*, 1992b).

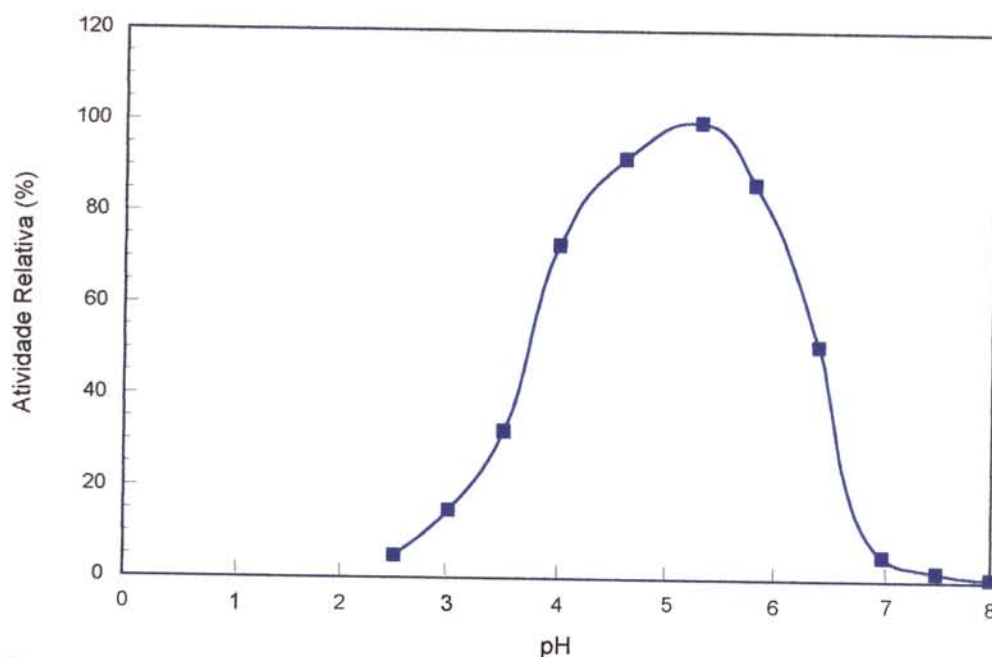


Figura 10: Efeito do pH na atividade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp* 771-1

4.5.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta, foi determinado conforme método descrito no item 3.2.8.2. A Figura 11 indica que a enzima foi estável entre pH 5,0 a 6,0, retendo cerca de 90% da sua atividade após 3 horas de incubação a 55°C, estando de acordo com os dados obtidos por HAYASHI *et alii* (1990) para a β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium sp* ATCC 20524. HAYASHI *et alii* (1992b) demonstraram que a β -frutofuranosidase não purificada de *Aspergillus japonicus* foi estável em pH 4 a 9, retendo 90% de sua atividade, após 15 minutos, nessa faixa de pH.

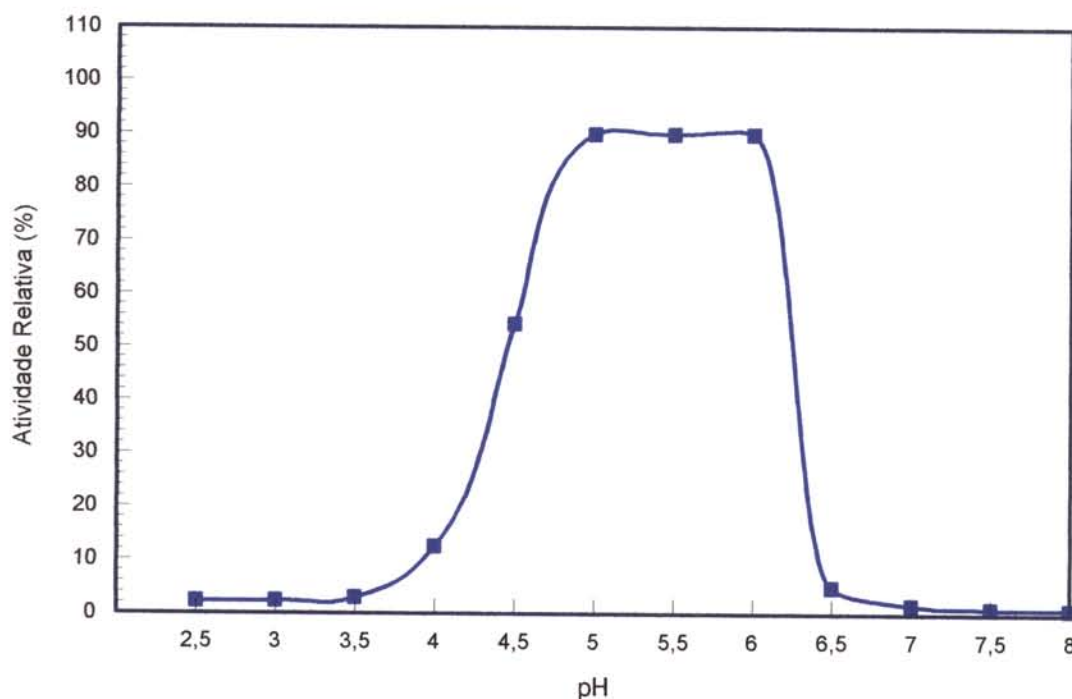


Figura 11: Efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp* 771-1

4.5.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase foi determinado de acordo com a metodologia constante no item 3.2.8.3. A Figura 12 ilustra que essa enzima apresentou atividade ótima a 55°C, idêntica, portanto, a frutossiltransferase extracelular bruta de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245, descrita por JUNG *et alii* (1989). A β -frutofuranosidase intracelular não purificada de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 descrita por HAYASHI *et alii* (1990), apresentou atividade ótima a 50°C.

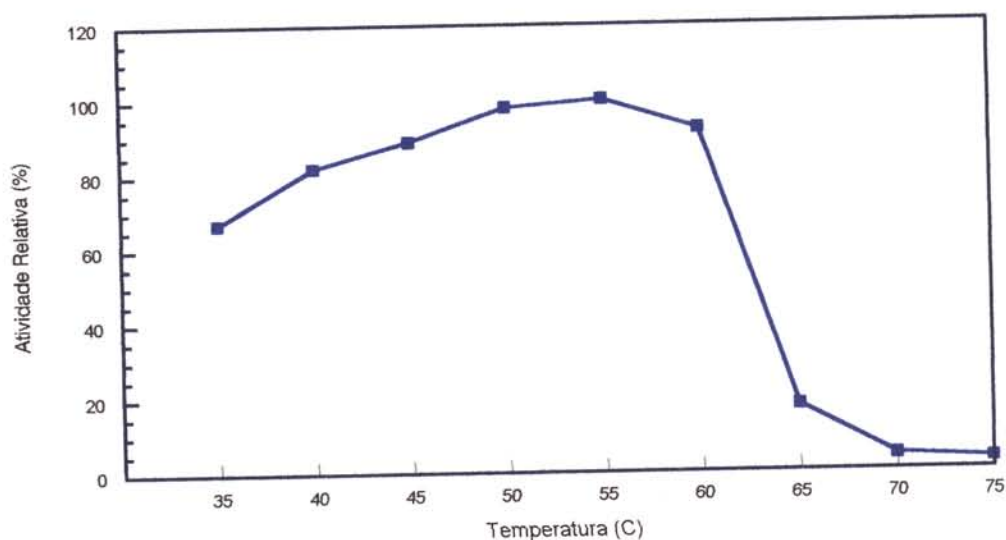


Figura 12: Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp* 771-1

4.5.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.8.4. A Figura 13 ilustra que a enzima foi estável nas temperaturas de 35 a 50°C. O tratamento térmico da β -frutofuranosidase a 55, 60 e 65°C, durante 30 minutos, resultou em 7, 78 e 92% de inativação, respectivamente, sendo totalmente inativada a 70°C. β -frutofuranosidasas não purificadas de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 e *Aspergillus japonicus*, citadas por HAYASHI *et alii* (1990 e 1992b), respectivamente, mostraram-se estáveis após tratamento térmico de 15 minutos, em temperaturas inferiores a 50°C, mantendo cerca de 86% da atividade a 60°C, mas sendo completamente inativadas a 70°C.

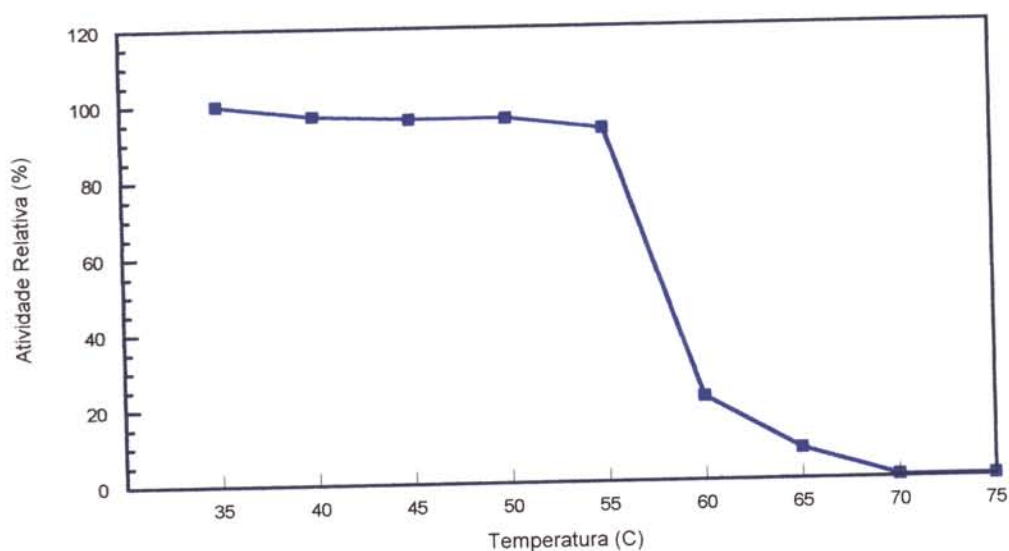


Figura 13: Efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular bruta de *Aureobasidium sp 771-1*

4.6. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE DE *Aureobasidium sp 771-1*

A produção e purificação da β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp 771-1* foram realizadas de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.2.7. e 3.2.9. O fluxograma de produção e purificação da referida enzima é ilustrado na Figura 14.

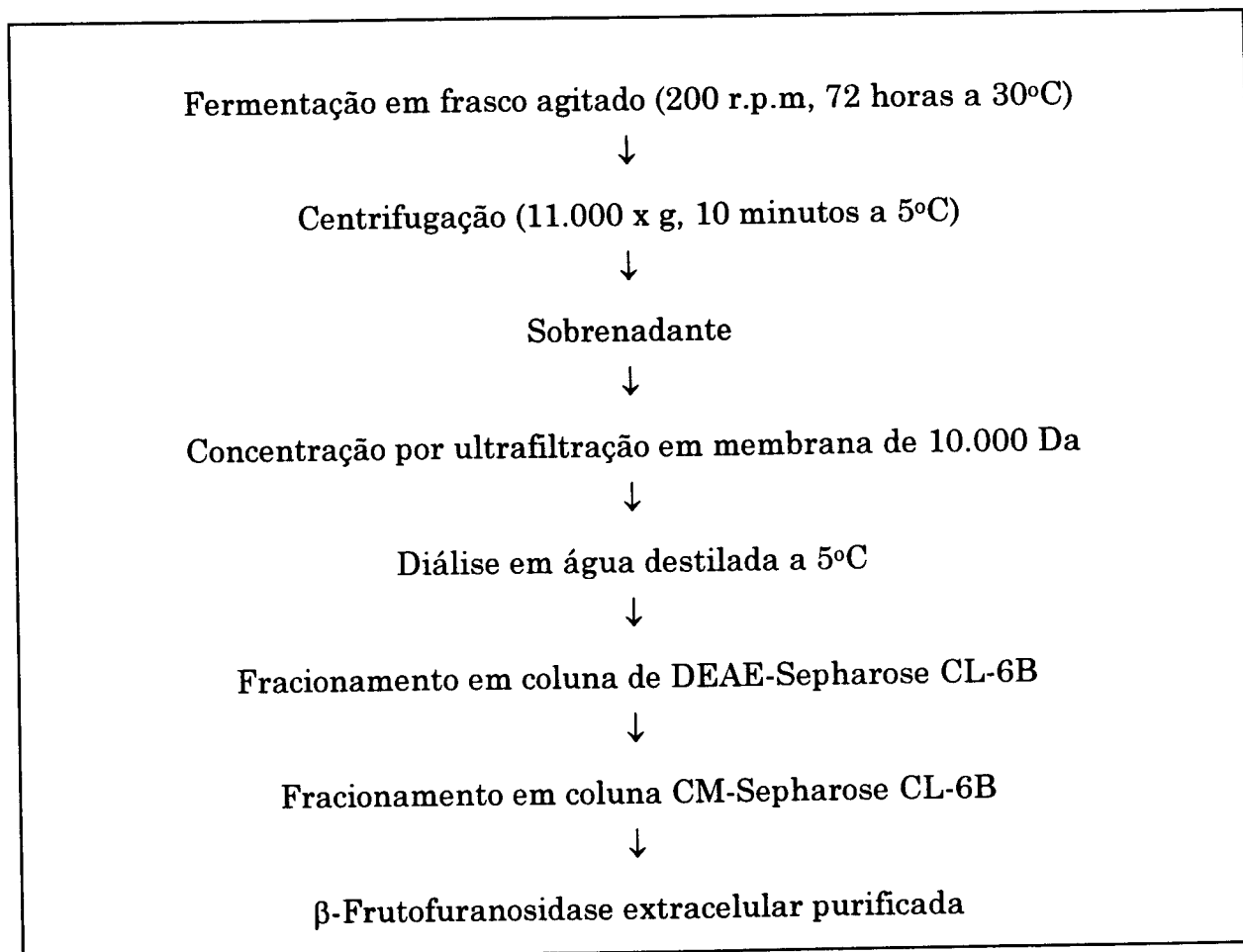


Figura 14: Fluxograma de produção e purificação da β -fructofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp* 771-1

Verificou-se no perfil cromatográfico das colunas de DEAE e CM Sepharose CL-B6, apresentado nas Figuras 15 e 16, respectivamente, que praticamente toda a enzima foi eluída com o tampão, mostrando que a β -fructofuranosidase não foi retida por ambas as resinas .

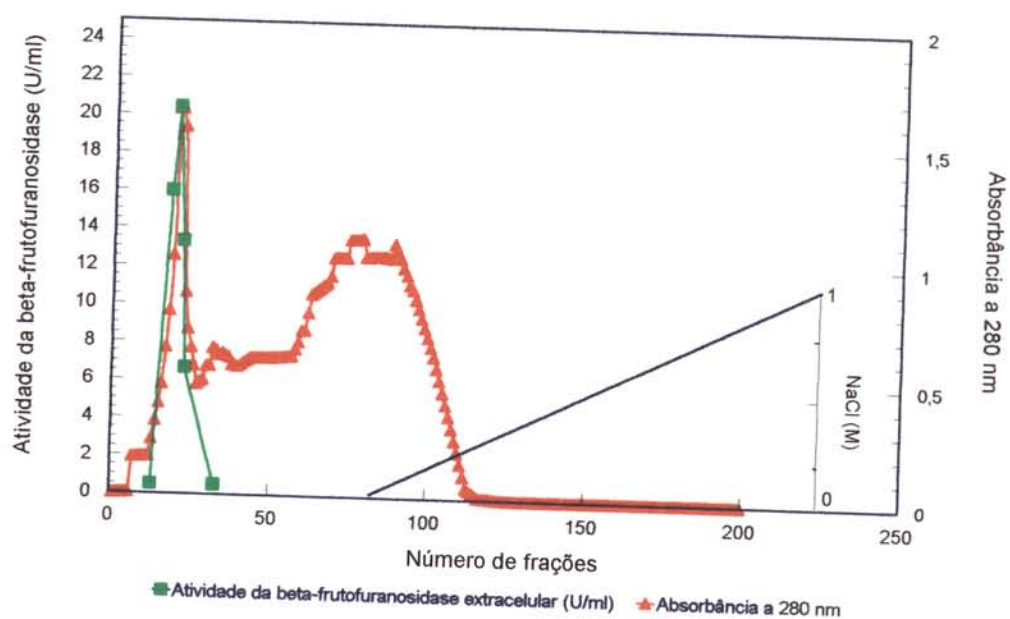


Figura 15: Cromatografia da β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium* sp. 771-1 em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B

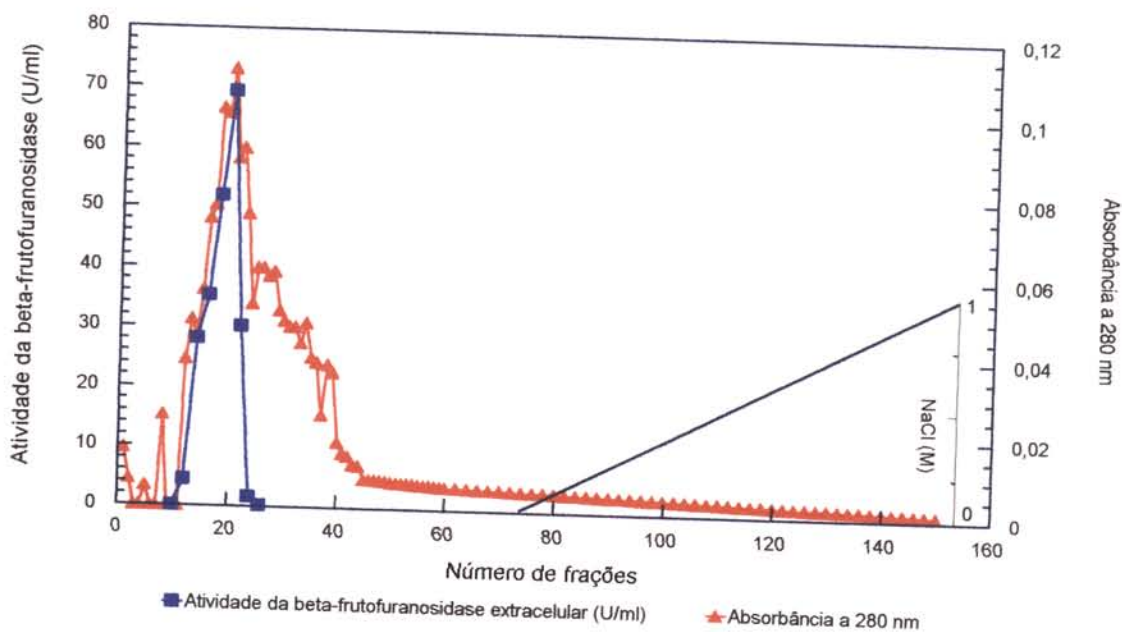


Fig. 16: Cromatografia da β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium* sp. 771-1 em coluna de CM-Sepharose CL-6B

A Tabela 4 apresenta o sumário dos processos utilizados na purificação da β -frutofuranosidase.

Tabela 4 - Purificação da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp. 771-1

Etapas	Volume (ml)	Atividade Total (Unidades)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (Unid./mg prot.)	Recuperação (%)	Purificação
Sobrenadante fermentado	3900	14430	1603	9,0	100	1
Concentração por ultrafiltração em membrana	200	11544	320	36	80	4
Cromatografia em coluna DEAE-Sephrose CL-6B	120	6205	34,5	180	43	20
Cromatografia em coluna CM-Sephrose CL-6B	90	1730	6,5	266	12	29,5

A β -frutofuranosidase foi purificada 20 vezes, após cromatografia em coluna de DEAE-Sephrose CL-6B, com 43% de recuperação e atividade específica de 180 unidades/mg proteína.

A cromatografia em coluna CM-Sephadex C-50, correspondente à última etapa de purificação, resultou em um aumento de 29,5 vezes na atividade específica da β -frutofuranosidase, equivalente a 266 unidades/mg proteína e recuperação de 12% em relação ao extrato bruto da enzima.

4.7. CARACTERIZAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

As características bioquímicas da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, foram determinadas como descrito no item 3.2.10.

4.7.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O efeito do pH, na atividade enzimática, foi testado conforme item 3.2.10.1. A Figura 17 demonstra que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, apresenta atividade ótima em pH 5,5.

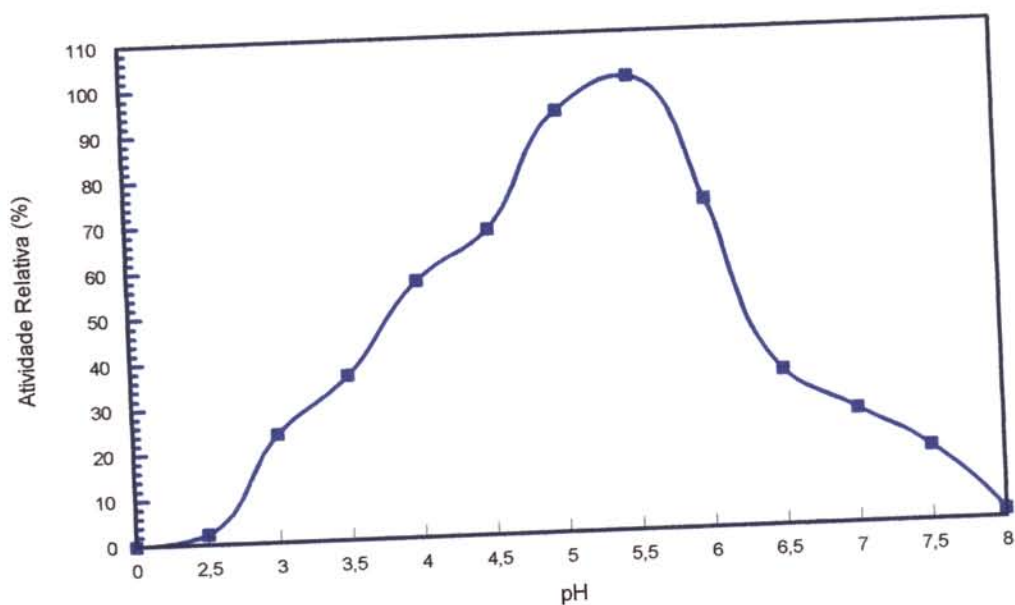


Figura 17: Efeito do pH na atividade enzimática da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

HAYASHI *et alii* (1992e) verificaram que o pH ótimo da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 era de 5,0-5,5. Estudos conduzidos por HIRAYAMA *et alii* (1989) e PARK & ALMEIDA (1991), com β -frutofuranosidasas extracelulares purificadas de *A. niger* ATCC 20611 e *Aspergillus niger*, mostraram que as enzimas apresentaram atividade ótima em pH 5,0 a 6,0 e 5,5 a 6,5, respectivamente.

HAYASHI *et alii* (1992c) e CHANG *et alii* (1994) relataram que a β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2 e a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 apresentaram atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,0 e 5,0 a 6,0, respectivamente.

4.7.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1.

O estudo do efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, foi descrito no item 3.2.10.2. A Figura 18 ilustra que a enzima apresenta estabilidade na faixa de 4,5 a 6,0, mantendo cerca de 90% de sua atividade nessa faixa de pH, após 3 horas de incubação a 55°C.

HAYASHI *et alii* (1991c; 1992e); LEE *et alii* (1992) relataram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 e frutossiltransferase intracelular purificada de *Aureobasidium pullulans* apresentaram, respectivamente, estabilidade na faixa de 4 a 9, com retenção de 90% de sua atividade, após incubação de 3 horas, e pH de estabilidade de 2.5 a 12, após 48 horas de incubação a 4°C.

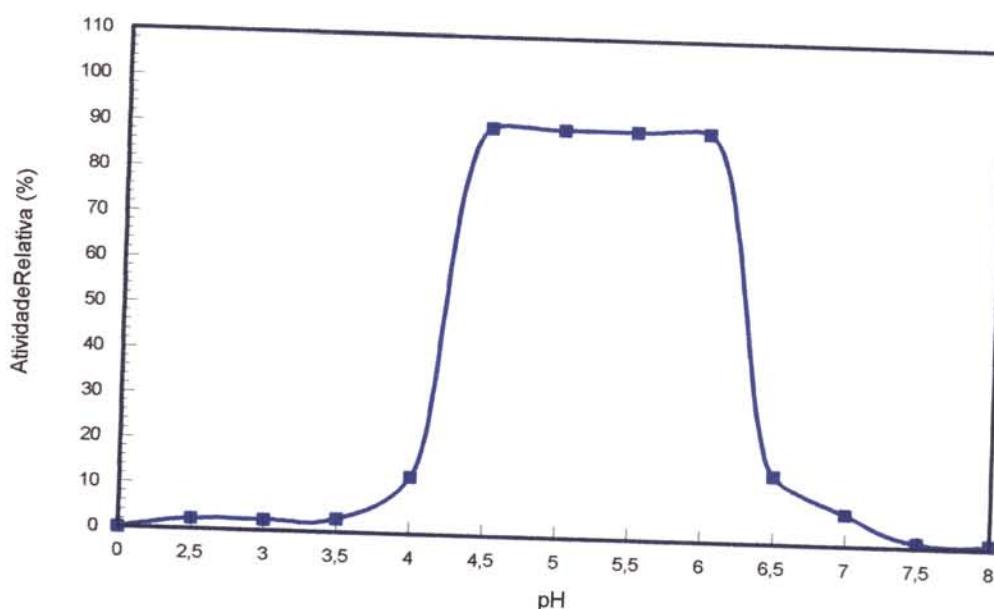


Figura 18: Efeito do pH na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

Segundo HIRAYAMA *et alii* (1989) e PARK & ALMEIDA (1991), as β -frutofuranosidases extracelulares purificadas de *A. niger* ATCC 20611 e *Aspergillus niger* apresentaram, respectivamente, pH de estabilidade de 4,5 a 10,0 (30 minutos de incubação) a 40°C e pH de 5,5 a 6,5.

Com relação às β -frutofuranosidases extracelulares purificadas de *Arthrobacter sp.* K-1 e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080, FUJITA *et alii* (1990b) e CHANG *et alii* (1994) detectaram, respectivamente, pH de estabilidade entre 5,5 a 10,0 (2 horas de incubação) a 40°C e 5 a 8 (30 minutos de incubação) a temperatura ambiente.

HAYASHI *et alii* (1992c) e DUAN *et alii* (1993) demonstraram que as β -frutofuranosidases intracelulares purificadas de *Aspergillus japonicus* MU-2 e *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1, foram estáveis em pH 4 a 9 (3 h de incubação) e 7,0 a 8,5 (2 h de incubação) a 37°C, respectivamente.

A partir dos dados obtidos nesse experimento e citados na literatura, verifica-se que há grande variabilidade quanto à estabilidade do pH das β -frutofuranosidases, que estão relacionados à linhagem microbiana e às condições testadas.

4.7.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1.

A influência da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, foi estudada medindo-se sua atividade nas temperaturas de 35 a 75°C, conforme metodologia descrita no item 3.2.10.3. A Figura 19 demonstra que a atividade enzimática foi máxima a 55°C.

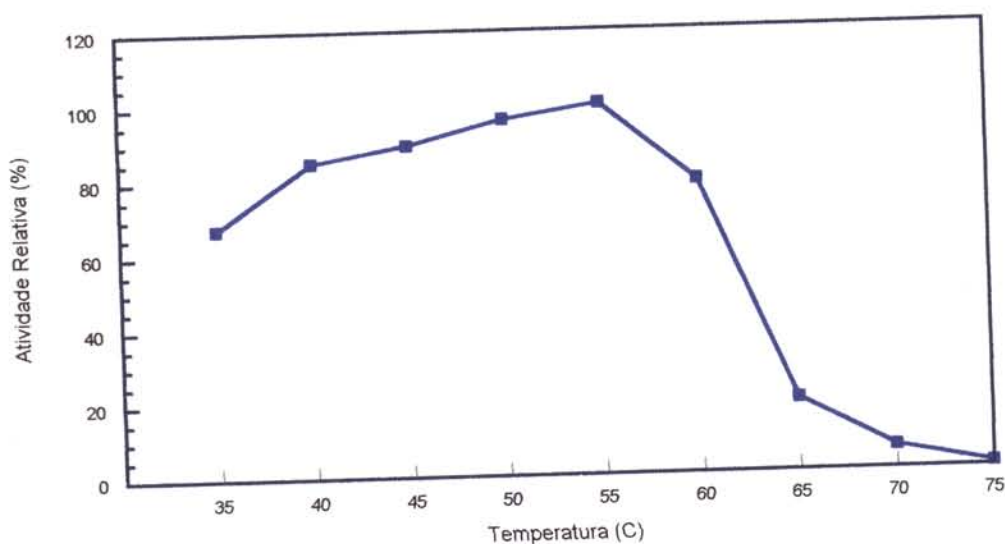


Figura 19: Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

Segundo HAYASHI *et alii* (1991c e 1992e), a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp.* ATCC 20524 apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 50-55°C.

As β -frutofuranosidases extracelulares purificadas de *Aspergillus niger* e *A. niger* ATCC 20611, descritas por HIRAYAMA (1989) e PARK & ALMEIDA (1991) mostraram, respectivamente, atividade ótima a temperatura de 50 a 60°C e 55°C.

FUJITA *et alii* (1990b) relataram que a temperatura ótima de atividade para β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Arthrobacter sp.* K-1 era de 55°C.

4.7.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1, foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.10.4. A β -frutofuranosidase mostrou-se estável após tratamento térmico a 50°C, durante 30 minutos. A 55°C observou-se uma perda de 6% em sua estabilidade. Após tratamento térmico a 60 e 65°C, durante 30 minutos, verificou-se 78 e 89% de inativação enzimática, respectivamente, com uma perda total da atividade a 70°C, conforme demonstra a Figura 20.

Segundo HAYASHI *et alii* (1991c 1992e) e LEE *et alii* (1992), a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 e frutossiltransferase intracelular purificada de *Aureobasidium pullulans* apresentaram-se estáveis, após tratamento térmico durante 15 minutos, em temperaturas inferiores a 50 e 55°C, respectivamente, sendo completamente inativadas na temperatura de 70°C.

HIRAYAMA *et alii* (1989) afirmaram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aspergillus niger* ATCC 20611 manteve 81% de sua atividade em temperaturas inferiores a 50°C, após 30 minutos de incubação, enquanto CHANG *et alii* (1994) constataram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 reteve 82% de sua atividade original em temperaturas inferiores a 50°C, depois de 30 minutos de incubação, ao contrário da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Arthrobacter sp.* K-1, que permaneceu estável em temperaturas inferiores a 45°C, mantendo cerca de 72% de sua atividade original, durante incubação a 60°C (FUJITA *et alii*, 1990b).

HAYASHI *et alii* (1992c) observaram que a β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2 foi estável a 50 - 60°C, retendo 94% de sua atividade máxima, após 15 minutos de incubação nessas temperaturas; contudo a 70°C, houve uma redução de 33% na atividade máxima, enquanto DUAN *et alii* (1993) relataram que a β -frutofuranosidase intracelular de *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 permaneceu estável em temperaturas inferiores a 56°C, após 20 minutos de incubação.

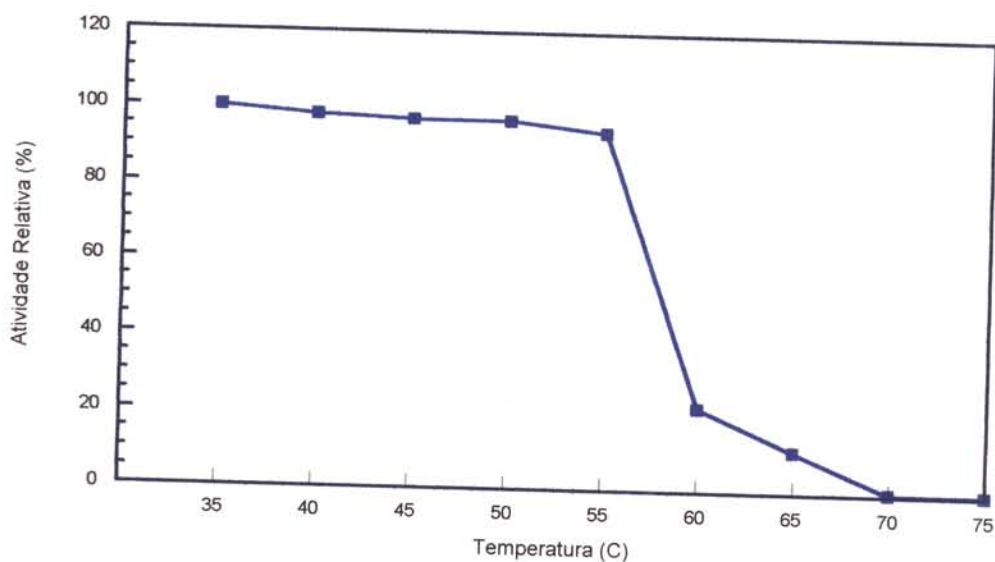


Figura 20: Efeito da temperatura na estabilidade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

4.7.5. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1.

O peso molecular da β -frutofuranosidase purificada de *Aureobasidium sp* 771-1 foi estimado em 200.000 dáltons através da filtração em gel Sephadex G-200, conforme metodologia descrita no item 3.2.10.5.

A Figura 21 mostra a relação entre o volume de eluição e o peso molecular das proteínas em coluna de Sephadex G-200.

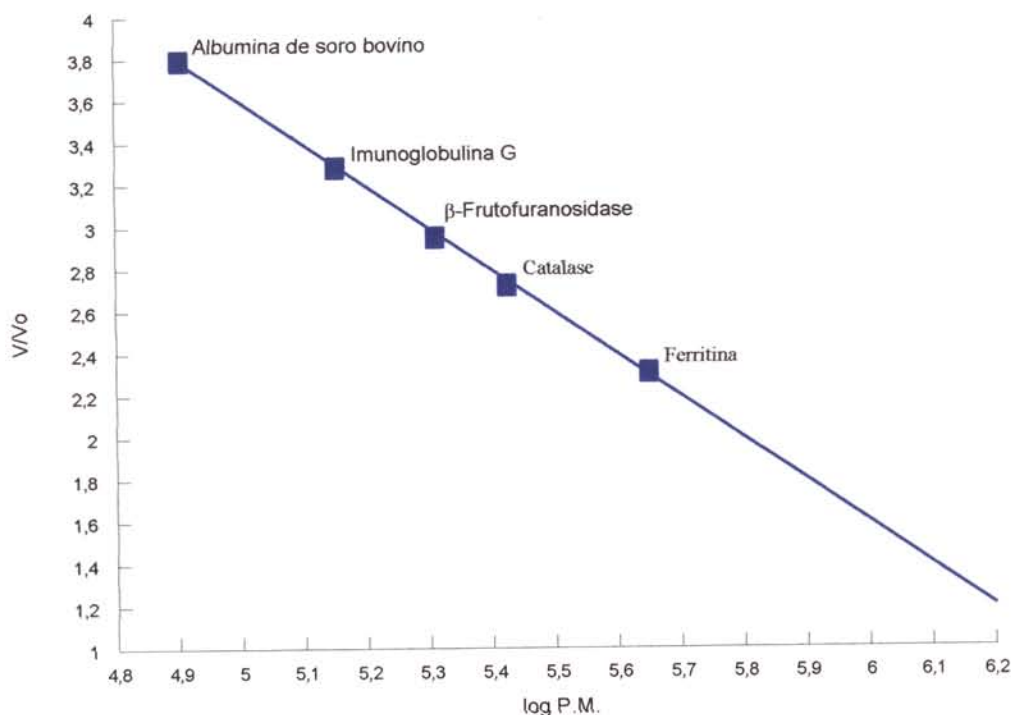


Figura 21: Relação entre o volume de eluição e o peso molecular das proteínas na coluna Sephadex G-200

LEE *et alii* (1991 e 1992) relataram que os pesos moleculares da frutotransferase extracelular e intracelular de *Aureobasidium pullulans* C-23 foram, respectivamente, 170.000 e 190.000 dáltons, cujos valores foram semelhantes ao peso molecular de 200.000 para a enzima de *Aureobasidium sp* 771-1, caracterizada nesse experimento.

HAYASHI *et alii* (1991c e 1992e) constataram que os pesos moleculares das β-frutofuranosidasas intracelulares e extracelulares purificadas de *Aureobasidium sp* ATCC 20524, determinados através de filtração em gel Sephadex G-200, foram 318.000 (P-1) e 346.000 (P-2), para as enzimas intracelulares e 304.000 (E-1), 315.000 (E-2) para as extracelulares. Estes valores são similares ao da β-frutofuranosidase intracelular de *Aspergillus niger* ATCC 20611, descritos por HIRAYAMA *et alii* (1989), que apresentou peso molecular de 340.000 daltons.

HAYASHI *et alii* (1992c) e DUAN *et alii* (1993) observaram, através de filtração em gel, que os pesos moleculares das β -frutofuranosidases intracelulares purificadas de *Aspergillus japonicus* MU-2 e *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1, foram respectivamente, 304.000 e 240.000 Da. FUJITA *et alii* (1990b) e CHANG *et alii* (1994) observaram que os pesos moleculares das β -frutofuranosidases extracelulares de *Arthrobacter sp* K-1 e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080, por filtração em gel, eram respectivamente, 51.000 e 87.000 Da.

De acordo com os dados apresentados, verifica-se que a variabilidade dos pesos moleculares das β -frutofuranosidases está correlacionada com o tipo da enzima, a linhagem microbiana da qual a enzima é originária e o teor de carboidratos da enzima.

4.7.6. EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS E INIBIDORES NA ATIVIDADE DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1.

O efeito inibitório de íons metálicos e de outros reagentes químicos, na atividade da β -frutofuranosidase, foi estudado incubando-se a enzima e o substrato na presença de sais minerais e outros reagentes químicos, nas concentrações de 1 e 10 mM a 55°C, durante 30 minutos, de acordo com metodologia descrita no item 3.2.10.6.

A Tabela 5 mostra que a enzima foi quase completamente inativada pelo HgCl_2 e I_2 , nas concentrações de 1 e 10 mM. As β -frutofuranosidases extracelulares de *Arthrobacter sp* K-1 e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080, bem como as β -frutofuranosidases intracelulares purificadas de *Aspergillus japonicus* MU-2 e *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1, foram, também, fortemente inibidas pelo Hg^{2+} , conforme dados citados, respectivamente, por (FUJITA *et alii*, 1990b; CHANG *et alii*, 1994) e (HAYASHI *et alii*, 1992c; DUAN *et alii*, 1993). Com

relação ao I_2 , LEE *et alii* (1992) relataram que a frutossiltransferase intracelular de *Aureobasidium pullulans* apresentou atividade residual de 76%, em solução de iodo 5mM, ao contrário da β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp* 771-1, que teve somente uma atividade residual de 1,31% em solução de iodo a 1mM. Quanto ao íon Ag^+ , a β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1 apresentou atividade relativa residual de 33,43% e 7,41% nas concentrações de 1mM e 10mM, respectivamente. A β -frutofuranosidase intracelular purificada (P-2) de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1991), β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2 e β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Artthrobacter sp* K-1 (FUJITA *et alii*, 1990b) também foram inibidas pelo íon Ag^+ , mostrando atividades relativas de 44%, 48% e 0,9%, respectivamente, nas concentrações de 1 mM. Os demais íons constantes da Tabela 5 não demonstraram um efeito inibitório significativo na atividade enzimática da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1, estando, portanto, em conformidade com o perfil inibitório apresentado pelos íons metálicos nas concentrações de 1mM sobre a atividade enzimática das β -frutofuranosidases, obtidas de diversas linhagens microbianas, citadas por HIRAYAMA *et alii*, 1989; FUJITA *et alii*, 1990b; LEE *et alii*, 1992; HAYASHI *et alii*, 1992c,e, 1993, 1994a; DUAN *et alii*, 1993; CHANG *et alii*, 1994.

A Tabela 5 ainda revela que os íons Ca^{2+} ; K^+ ; Co^{2+} e Al^{3+} foram estimulantes da atividade enzimática da β -frutofuranosidase, nas concentrações de 1mM.

Segundo HAYASHI *et alii* (1991c), o íon Ca^{2+} , na concentração de 1mM, estimula a atividade das β -frutofuranosidases intracelulares purificadas (P₁ e P₂) de *Aureobasidium sp* ATCC 20524. HAYASHI *et alii* (1992c), também, detectaram um aumento de 108% na atividade relativa da β -frutofuranosidase intracelular de *Aspergillus japonicus* MU-2, ocasionado pelo $CaCl_2$, na concentração de 1mM. Deve-se ressaltar que os íons metálicos podem interferir nas atividades das enzimas glicose-oxidase e peroxidase, utilizadas na

determinação da atividade enzimática da β -frutofuranosidase, conforme metodologia descrita no item 3.2.10.6.

Tabela 5 - Efeito de íons metálicos na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp.*771-1

ÍON METÁLICO	ATIVIDADE RELATIVA (%)	
	1mM	10mM
Iodo	1,31	4,16
HgCl ₂	2,26	2,87
AgNO ₃	33,43	7,41
Pb(OAc)	53,29	106,0
MnSO ₄	78,77	73,54
FeSO ₄	75,96	8,32
CuSO ₄	100,20	18,41
BaCl ₂	90,77	96,0
FeCl ₃	87,48	10,11
ZnSO ₄	93,21	8,13
MgSO ₄	85,74	37,34
KCl	113,72	71,80
CoCl ₂	105,21	19,0
CaCl ₂	104,53	67,76
AlCl ₃	111,25	3,42
Controle	100,00	

Quando a β -frutofuranosidase extracelular de *Aureobasidium sp* 771-1 foi tratada com reagentes específicos para determinados grupos funcionais,

verificou-se que a enzima foi inativada pela N-bromosuccinimida (Tabela 6) e sais de iodo (Tabela 5), que são específicos para triptofano e tirosina, respectivamente, sugerindo que grupos indol e fenol façam parte do sítio ativo da enzima ou estejam localizados próximos a ele (LEE *et alii*, 1992 e CHANG *et alii*, 1994). Pré-incubando a enzima com p-hidroximercuribenzoato, que apresenta reatividade específica com grupos sulfidríla (FARFAN, 1990), observou-se que a enzima não foi significativamente afetada por esse reagente na concentração de 1mM, mas foi inibida a 10mM (Tabela 6). A β -frutofuranosidase extracelular apresentou atividade relativa de 88,77% e 91,55%, quando em contato com o agente quelante EDTA, nas concentrações de 1mM e 10 mM, respectivamente, indicando que os metais não são essenciais para ação de transferência dessa enzima (HIRAYAMA *et alii*, 1989; LEE *et alii*, 1992; CHANG *et alii*, 1994)). Os demais reagentes, constantes da Tabela 6, tiveram pouco efeito na atividade da enzima.

Tabela 6 - Efeito de inibidores na atividade da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp.* 771-1

ATIVIDADE RELATIVA (%)		
REAGENTES	1mM	10mM
Bromosuccinimida	20,00	6,0
Arseniato	45,35	16,60
Anilina	44,67	52,61
ρ -Cloromercuribenzoato	52,81	69,46
Mercaptoetanol	62,14	62,31
Dietilditiocarbamato de sódio	57,55	1,33
Cisteína	71,40	58,42
Oxalato de sódio	82,88	80,80
Bissulfito de sódio	81,71	33,17
Azida sódica	84,92	66,50
EDTA	88,77	91,55
ρ -Hidroximercuribenzoato	84,77	0,84
Controle	100,0	

4.7.7. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE K_m E V_{max} DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1

Os valores de K_m e V_{max} da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771, para o substrato sacarose, determinados pelo gráfico de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934), mostrados na Figura 22 e determinados conforme metodologia descrita no item 3.2.10.7., foram, respectivamente, 0,36 M e 6,3 $\mu\text{mol/ml/min}$. Tais resultados são semelhantes aos obtidos por HAYASHI *et alii* (1992e), para as β -frutofuranosidases extracelulares

purificadas de *Aureobasidium* sp ATCC 20524, tendo a sacarose como substrato e cujos valores de K_m para E-1 e E-2 foram, respectivamente, 0,34 e 0,28 M, enquanto para V_{max} de E-1 e E-2, corresponderam a 6,66 e 8,70 $\mu\text{mol/ml/min}$. Também, HAYASHI *et alii* (1991c) encontraram para β -frutofuranosidases intracelulares purificadas (P-1 e P-2) de *Aureobasidium* sp ATCC 20524, os valores de K_m , para P-1 e P-2, de 0,47 e 0,65 M, respectivamente. As V_{max} para P-1 e P-2 foram 6,84 e 8,73 $\mu\text{mol/ml/min}$.

LEE *et alii* (1992) observaram que a frutossiltransferase intracelular de *Aureobasidium pullulans* apresentou um K_m de 0,43 mM para o substrato sacarose.

Segundo HIRAYAMA *et alii* (1989), FUJITA *et alii* (1990b) e CHANG *et alii* (1994) as β -frutofuranosidases extracelulares purificadas de *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Arthrobacter* sp. K-1 e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de K_m para sacarose: 0,29M, 9,1 mM, e 0,53M. HAYASHI *et alii* (1992c) relataram que a β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus japonicus* MU-2, mostrou valores de K_m e V_{max} para a sacarose, de 210 mM e 0,65 $\mu\text{mol/ml/min}$, respectivamente, enquanto as β -frutofuranosidases intracelulares purificadas (P-1 e P-2) de *Fusarium oxysporum* apresentaram valores de K_m , de 4,4 mM e 2,1 mM, respectivamente, para P-1 e P-2 (NISHIZAWA *et alii*, 1980).

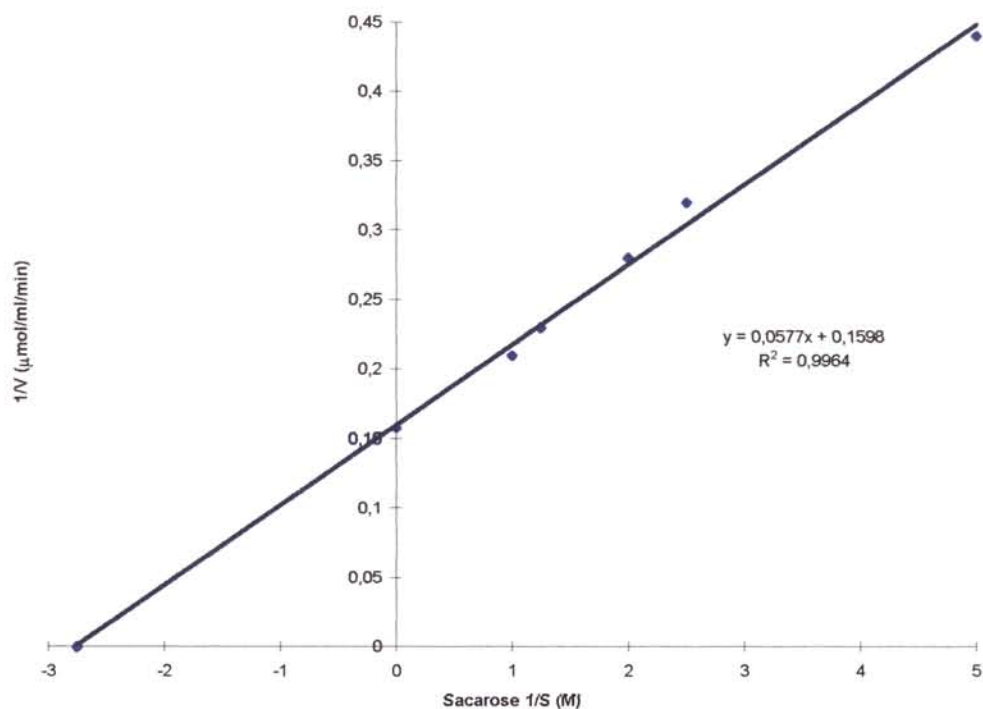


Figura 22: Determinação do K_m e $V_{\max}$ de β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

Comparando-se os dados de K_m e $V_{\max}$, obtidos nesse experimento, com os valores citados na literatura, verifica-se que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1 apresenta K_m maiores que as β -frutofuranosidasas de *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Arthrobacter sp* K-1, *Aspergillus japonicus* MU-2 e *Fusarium oxysporum*, porém similares aos valores de K_m e $V_{\max}$ de *Aureobasidium sp* ATCC 20524.

4.4.8. APLICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR PURIFICADA DE *Aureobasidium sp* 771-1, NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A produção de frutooligossacarídeos, a partir de soluções 30% e 50% de sacarose, catalisada pela β -frutofuranosidase, foi testada a 55°C, conforme metodologia descrita no item 3.2.11.

A conversão de sacarose a frutooligossacarídeos pela β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1, está ilustrada nas Figuras 23a e 23b e Tabela 7.

Verifica-se, na Tabela 7, que 57% dos frutooligossacarídeos produzidos durante 24 horas de fermentação, em solução de sacarose 30%, eram constituídos de 30% de 1-kestose; 24% de nistose e 3% de frutofuranosil nistose.

Quando foi utilizada solução 50% de sacarose como substrato, foram obtidos 61% de frutooligossacarídeos, com formação de 38% de 1-kestose, 20% de nistose e 3% de frutofuranosil nistose.

Tabela 7 - Conversão de sacarose a frutooligossacarídeos através da β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1

	Sacarose como substrato	
Açúcares	30%	50%
1-Kestose (GF ₂)	30,0%	38,0%
Nistose (GF ₃)	24,0%	20,0%
Frutofuranosilnistose(GF ₄)	3,0%	3,0%
Glicose	31,0%	25,0%
Frutose	2,0%	2,0%
Sacarose	10,0%	12,0%
Total FOS	57%	61,0%

Tempo da reação enzimática: 24 horas

Esses resultados indicam que a atividade de transferência da β -frutofuranosidase, com conseqüente formação de frutooligossacarídeos, foi menor, ou seja, 57%, em concentrações mais baixas de sacarose (30%), e maior, 61%, em teores elevados de sacarose (50%); estando, portanto, em conformidade com os dados citados na literatura (HIDAKA *et alii*, 1988; HIRAYAMA *et alii*, 1989; HAYASHI *et alii*, 1993; CHANG *et alii*, 1994), que afirmam que em altas concentrações de sacarose, há uma capacidade maior de transfrutossilação para essa enzima, e que a produção de frutooligossacarídeos aumenta à medida em que há uma elevação na concentração do substrato.

Os principais frutooligossacarídeos produzidos pela β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* 771-1 foram 1-kestose e nistose, destacando-se a 1-kestose cuja produção foi de 38% e 30%, a partir de concentrações de sacarose de 50% e 30%, respectivamente. Também, verificou-se que em 50% de sacarose, houve uma menor produção de nistose, após 24 horas de reação a 55°C (Tabela 7). O ápice de

formação da 1-kestose foi com 16 e 12 h de reação, utilizando-se 30 e 50% de sacarose, respectivamente, porém o teor de 1-kestose foi declinando, provavelmente, em virtude de a 1-kestose estar sendo convertida mais rapidamente a nistose e frutofuranosil nistose. Durante essa reação de transfrutossilação, a sacarose foi rapidamente convertida a GF₂, havendo um decréscimo no decorrer do período de incubação, enquanto os teores de GF₃ e GF₄ aumentaram, conforme demonstram as Figuras 23a e 23b.

As Figuras 23a, 23b e Tabela 7 ilustram a formação de glicose e frutose como subprodutos. O consumo de sacarose foi interrompido em cerca de 10-12% do total de sacarídeos, obtendo-se uma conversão máxima de sacarose a frutooligossacarídeos de 57 a 61%, através da ação enzimática da β -frutofuranosidase, em 24 h de reação. Segundo YUN *et alii* (1990, 1994a) e YUN & SONG (1993), a glicose liberada, durante a reação enzimática, age como inibidor competitivo da enzima, limitando a conversão de sacarose a frutooligossacarídeos em, aproximadamente, 55-60%. DUAN *et alii* (1994) relataram que a glicose, também, inibe competitivamente a 1-kestose e nistose como substratos. HIDAKA *et alii* (1988) e DUAN *et alii* (1993) constataram que o consumo de sacarose foi interrompido em, aproximadamente, 10% do total de açúcares.

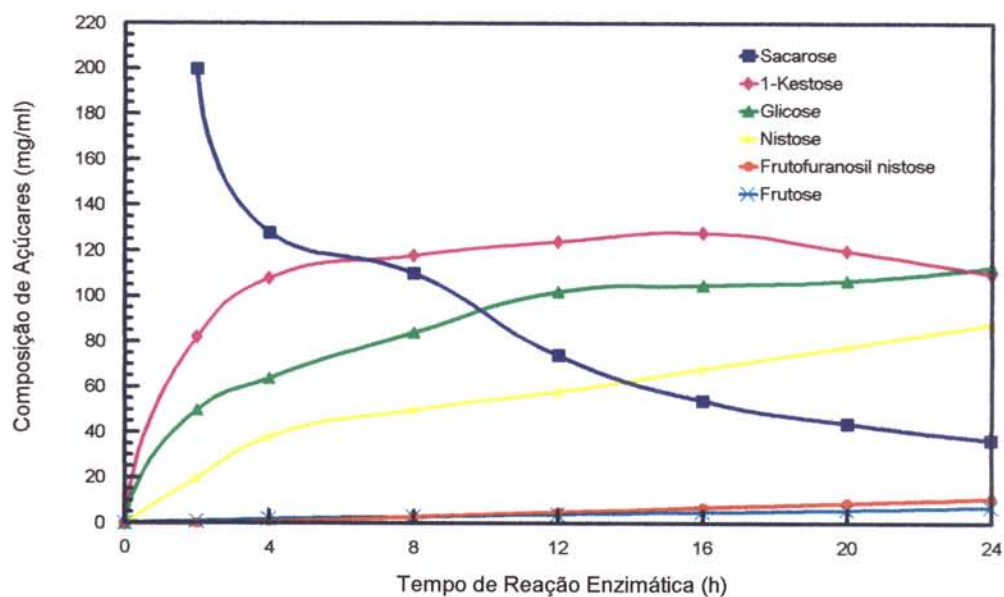


Fig. 23a: Conversão da sacarose a frutooligosacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp* 771-1 (30% de sacarose)

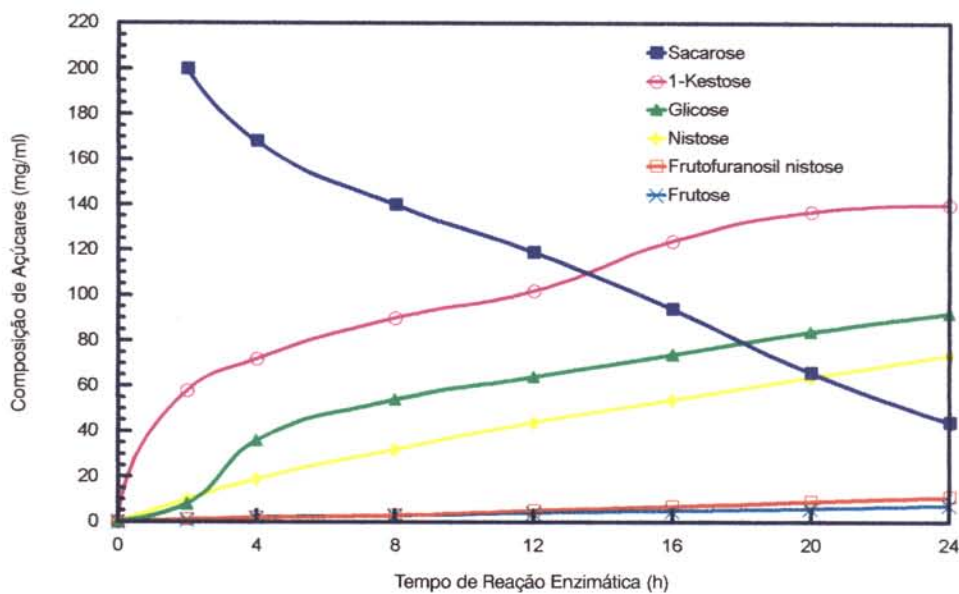


Fig. 23b: Conversão da sacarose a frutooligosacarídeos por β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Aureobasidium sp*. 771-1 (50% de sacarose)

As características da produção de frutooligossacarídeos, através da transfrutossilação enzimática da β -frutofuranosidase, foram muito similares entre os microrganismos: *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIDAKA *et alii*, 1988); *Aureobasidium sp* (YUN *et alii*, 1990 e 1992a); *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 (DUAN *et alii*, 1993).

A produção máxima de 1-kestose e demais frutooligossacarídeos pelo *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524 e *Aspergillus foetidus* NRRL 337 foram 60% 58% e 57%, respectivamente (HIDAKA *et alii*, 1988; YUN & SONG, 1993; YUN *et alii*, 1994a; HANG *et alii*, 1995 e HANG & WOODMAS, 1995). Neste experimento, a produção de frutooligossacarídeos foi de 61% a partir de 50% de sacarose.

5. CONCLUSÕES

1. Foram isoladas 1752 linhagens de microrganismos provenientes de pólen de flores, mel, solo, folhas e caule de vegetais, sendo a sua maioria leveduras osmofílicas. Deste total, 52 linhagens foram produtoras de frutooligossacarídeos, 409 hidrolisaram sacarose a glicose e frutose, 54 foram produtoras de polióis e outros açúcares não identificados.

2. As 52 linhagens produtoras de frutooligossacarídeos transformaram sacarose a frutooligossacarídeos, através das β -frutofuranosidases, que possuem maior atividade de transferência do que atividade de hidrólise, enquanto que as 409 linhagens que realizaram a inversão da sacarose a glicose e frutose, catalisadas pela mesma enzima β -frutofuranosidase, apresentaram maior atividade hidrolítica do que de transferência.

3. Dentre as 52 linhagens produtoras de β -frutofuranosidase com atividade de transferência, foi selecionada uma levedura osmofílica n.º 771-1, por apresentar maior atividade de transferência, em relação às demais.

A linhagem n.º 771-1 é produtora de β -frutofuranosidase extracelular e intracelular, e possui atividade enzimática maior na forma extracelular que intracelular. A linhagem n.º 771-1 foi identificada como *Aureobasidium sp* (De Bary), de acordo com a descrição de COOKE (1962).

A β -frutofuranosidase extracelular purificada apresentou as seguintes características enzimáticas: pH e temperatura ótima de atividade de 5,5 e 55°C, respectivamente, estabilidade em temperaturas inferiores a 55°C, peso molecular de 200.000 dáltons, valores de K_m e V_{max} de 0,36M e 6,3 μ mol/ml/min., respectivamente para o substrato sacarose, sendo inibida pelos íons Hg^+ , e I_2 e também pelos reagentes bromosuccinimida e p -hidroximercuribenzoato nas concentrações de 1 e 10 mM.

4. Na conversão de solução 50% de sacarose pela β -frutofuranosidase em pH 5,5 a 55°C, durante 24 horas, foram produzidos 61% de frutooligossacarídeos constituídos de: 38% de 1-kestose, 20% de nistose e 3% de frutofuranosil nistose.

Conclui-se, a partir dos resultados deste estudo, que a preparação enzimática de β -frutofuranosidase de *Aureobsidium sp* 771-1 é uma fonte potencial para a produção de frutooligossacarídeos, pois apresenta certas características favoráveis: são osmofílicas e termoestáveis. Altas temperaturas em combinação com altas concentrações de substrato previnem a contaminação microbiana do meio. Deve-se ressaltar, ainda, que a produção comercial de frutooligossacarídeos é realizada em concentrações superiores a 30% (p/v) de sacarose, e, no caso específico da β -frutofuranosidase produzida por essa linhagem, houve maior formação de frutooligossacarídeos em soluções a 50% de sacarose.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

Produção contínua de frutooligossacarídeos através da imobilização da β -frutofuranosidase.

Estudar um sistema misto constituído das enzimas β -frutofuranosidase e glicose-oxidase visando uma maior produção de frutooligossacarídeos.

Considerando que a linhagem de *Aureobasidium sp* 771-1 é potencialmente viável para ser utilizada a nível industrial, determinar a condições ótimas de produção da β -frutofuranosidase e de frutooligossacarídeos para essa ampliação de escala.

Seleção de linhagens mutantes com maior capacidade de conversão de sacarose em frutooligossacarídeos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBON, N.; BELL, D.J.; BLANCHARD, P.H.; GROSS, D.; RUNDELL, J.T.

Kestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 24-27, 1953.

ALEGRET, P.L. Fructooligosacaridos. **Alimentaria**, v. 272, p. 21-23, 1996.

ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of protein related to their molecular weights over a wide range. **The Biochemical Journal**, v. 96, p. 595-605, 1965.

ARAI, S. Studies of functional foods in Japan - state of the art. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, v. 60, p. 9-15, 1996.

ARONOFF, S.; BACON, J.S.D. The action of invertase. Preparations II. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 41, p. 476-478, 1952.

BACON, J.S.D. The oligosaccharides produced by the action of yeast invertase preparations on sucrose. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 320-328, 1954.

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

BACON, J.S.D; EDELMAN, J. The action of invertase preparations. **Archives of Biochemistry**, v. 28, p. 467-468, 1950.

BACON, J.S.D.; EDELMAN, J. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other *Compositae*. **The Biochemical Journal**, v. 48, p. 114-126, 1951.

BADR-ELDIN, S.M.; EL-TAYEB, O.M.; EL-MASRY, H.G.; MOHAMAD, F.H.A.; ABB EL-RAHMAN, O.A. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 423-426, 1994.

- van BALKEN, J.A.M.; van DOOREN, J.G.M.; van den TWEEL, W.J.J.; KAMPHUIS, J.; MEIJER, E.M. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F-fructosyltransferase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 216-221, 1991.
- BARTHOMEUF, C.; POURRAT, H. Production of high-content fructo-oligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 911-916, 1995.
- BEALING, F.J. Mould "glucosaccharase": a fructosidase. **The Biochemical Journal**, v. 55, p. 93-101, 1953.
- BEALING, F.J.; BACON, J.S.D. The action of mould enzymes on sucrose. **The Biochemical Journal**, v. 53, p. 277-285, 1953.
- BINKLEY, W.W.; ALTENBURG, F.W. Nistose, a fructosyl-1-kestose. **The International Sugar Journal**, v. 67, p. 110-112, 1965.
- BLANCHARD, P.H.; ALBON, N. The inversion of sucrose; a complication. **Archives of Biochemistry**, v. 29, p. 220-222, 1950.
- CARLSSON, N.G.; KARLSSON, H.; SANDBERG, A.S. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p.2404-2412, 1992.
- CARPITA, N.C.; KANABUS, J.; HOUSLEY, T.L. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinacea* Leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 162-168, 1989.
- CHANG, C.T.; LIN, Y.Y. TANG, M.S.; LIN, C.F. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 32, p. 269-277, 1994.
- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; THORNLEY, W.R.; BENNETT, J.H. Purification and quantification of kestoses (frutosylsucroses) by gel permeation

- and anion exchange chromatography. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 27, p. 289-295, 1989a.
- CHATTERTON, N.J.; THORNLEY, W.R.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H. Fructosyltransferase and invertase activities in leaf extracts of six temperate grasses grown in warm and cool temperatures. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, p. 301-305, 1989b.
- CHEETHAM, P.S.J.; GARRET, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985.
- CHEETHAM, P.S.J.; HACKING, A.J.; VLITOS, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p.212-219, 1989.
- CHEN, W.C. β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* in shaking batch cultures as affected by inicial concentration **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 69-72, 1996.
- CHILDS, N. Functional foods and market entry. **The World of Ingredients**, p. 36-39, oct/nov, 1994.
- CHO, W.T.; LIM, J.Y. Optimum culture conditions for the production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans* C-23. **Korea Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 417-422, 1990a.
- CHO, W.T.; LIM, J.Y.; LEE, S.S. Isolation and identification of the black yeast producing fructosyl transferase. **Korea Journal of Mycology**, v. 18, p. 20-25, 1990b.
- COOKE, B. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. **Mycopathologia et Micologia Applicata**, v.12, p. 1-45, 1959.
- COOKE, B. A taxonomic study in the black yeasts. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 17, p. 1-43, 1962.

- COOKE, B.; MATSUURA, G. Physiological studies in the black yeasts. **Mycopathologia et Micologia Applicata**, v. 21, p. 225-271, 1963.
- CPC INTERNATIONAL INC., R.E. Heady. **Preparation of high fructose syrups from sucrose**. Int. Cl.³ C 12 P 19/24. U.S. n. 4276379. 9 jun. 1978; 30 jun. 1981
- CPC INTERNATIONAL INC., J.A. Smith; D. Grove; S.J. Luenser; L.G Park. **Process for the production of fructose transferase enzyme** Int. Cl.³ C 12 N 9/10. U.S. n. 4309505. 19 maio 1980; 5 jan. 1982.
- DICKERSON, A.G. A β -D-fructofuranosidase from *Claviceps purpurea*. **The Biochemical Journal**, v. 129, p. 263-272, 1972.
- DESHPANDE, M.S.; RALE, V.B.; LYNCH, J.M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 514-527, 1992.
- DUAN, K.J.; SHEU, D.C.; CHEN, J.S. Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, v. 57, p. 1811-1815, 1993.
- DUAN, K.J.; CHEN, J.S.; SHEU, D.C. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p. 334-339, 1994.
- DURRELL, L.W. Studies of *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v.35, p. 113-120, 1967.
- DWORSCHACK, R.G.; WICKERHAM, L.J. Production of extracellular and total invertase by *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. **Applied Microbiology**, v.9, p. 291-294, 1961.
- DZIEZAK, J.D. Special report: sweeteners and product development. **Food Technology**, v. 40, p. 111-128, 1986.
- EDELMAN, J. Transfer reactions catalysed by some sucrase preparations. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 22-33, 1954.

- EDELMAN, J. The formation of oligosaccharides by enzymic transglycosylation. **Advances in Enzimology**, v. 17, p. 189-232, 1956.
- EDELMAN, J.; BACON, J.S.D. Transfructosidation in extracts of the tubers of *Helianthus tuberosus* L. **The Biochemical Journal**, v. 49, p. 529-540, 1951.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus* L. **New Phytologist**, v. 67, p. 517-531, 1968.
- FARFAN, J.A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, UNICAMP, 1990. 134p.
- FEDERICI, F. Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v. 74, p. 738-743, 1982.
- FISHBEIN, L.; KAPLAN, M.; GOUGH, M. Fructooligosaccharides: a review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 30, p. 104-107, 1988.
- FUCHS, A. Current and potencial food and non-food applications of fructans. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 555-560, 1991.
- FUJITA, K.; KUWAHARA, N.; TANIMOTO, T.; KOIZUMI, K.; IZUKA, M.; MINAMIURA, N.; FURUICHI, K.; KITAHATA, S. Chemical structures of hetero-oligosaccharides produced by *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 239-243, 1994.
- FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp K-1 **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 2655-2661, 1990a.
- FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 913-919, 1990b.
- GADD, G.M. The use of solid medium to study effects of cadmium, copper and zinc on yeasts and yeast-like fungi: applicability and limitations. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 57-62, 1983.

- GADD, G.M.; ROME, L. Biosorption of copper by fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 610-617, 1988.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. **Food Microbiology**, v. 11, p. 491-498, 1994a.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 412-420, 1994b.
- GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; LOO, J.V. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria - implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 381-387, 1994.
- GORBACH, G.; SCHNEITER, R. Zur Frage der Melezitose durch die Biene. **Biochem. Zeitschrift**, v. 296, p. 367-372, 1938.
- GROSS, D. BLANCHARD, P.H.; BELL, D.J. Neokestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 1727-1730, 1954.
- GUPTA, A.K.; BHATIA, I.S. Glucofructosan Biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2557-2563, 1980.
- HAJNY, G.J.; HENDERSHOT, W.F.; PETERSON, W.H. Factors affecting glycerol production by a newly isolate osmophilic yeast. **Applied Microbiology**, v. 8, p. 5-11, 1960.
- HAJNY, G.J.; SMITH, J.H.; GARVER, J.C. Erythritol production by a yeastlike fungus. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 240-246, 1964.
- HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 741-744, 1995.
- HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E.; JANG, K.Y. Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 295-298, 1995.

- HANKIN, L.; McINTYRE, J.L. Production of kestose (fructosyl sucroses) by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 522-524, 1977.
- HAYASHI, S.; HAYASHI, T.; KINOSHITA, J. TAKASAKI, Y. & IMADA, K. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524 on porous silica. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 247-250, 1992a.
- HAYASHI, S.; IMADA, K.; KUSHIMA, Y.; UENO, H. Observation of the chemical structure of fructooligosaccharide produced by an enzyme from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. **Current Microbiology**, v. 19, p. 175-177, 1989.
- HAYASHI, S.; ITO, K.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Immobilization of a fructosyl-transferring enzyme from *Aureobasidium* sp. on shirasu porous glass. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 68-70, 1991a.
- HAYASHI, S. KINOSHITA, J.; NONOGUCHI, M. TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 395-398, 1991b.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; INOMATA, Y.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Properties of *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase immobilization on porous silica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 216-220, 1993.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 155-159, 1992b.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*.

- World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 276-279, 1992c.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; IMADA, K.; UENO, H. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, p. 395-400, 1990.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Effect of deglycosylation on the properties of β -fructofuranosidase P-1 from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 251-255, 1992d.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Purification and properties of extracellular β -fructofuranosidases from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 145-147, 1992e.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y. UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 251-256, 1991c.
- HAYASHI, S.; SASAO, S. TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* on DEAE-cellulose. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 103-105, 1994a.
- HAYASHI, S.; SHIMOKAWA, Y.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Nutritional status of *Aureobasidium sp.* ATCC 20524 for production of β -fructofuranosidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 522-525, 1991d.
- HAYASHI, S. SHIMOKAWA, Y.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Properties of the glycosylated β -fructofuranosidase P-2 from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 191-194, 1992f.

- HAYASHI, S.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 227-228, 1994b.
- HENDERSON, R.W.; MORTON, R.K.; RAWLINSON, W.A. Oligosaccharide synthesis in the banana and its relationship to the transferase activity of invertase. **The Biochemical Journal**, v.72, p. 340-344, 1959.
- HENRY, R.J.; DARBYSHIRE, B. Sucrose: sucrose fructosyltransferase and fructan: fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1017-1020, 1980.
- HESTRIN, S. The specificity of mould maltase. **Enzymologia**, v. 8, p. 193-203, 1940.
- HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKANAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobactéria Microflora**, v. 5:, p. 37-50, 1986.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p. 1181-1187, 1988.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 561-565, 1991.
- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p 667-673, 1989.
- HOOVER, D.G. Bifidobacteria: activity and potencial benefits. **Food Technology**, v. 47, p.120-122, 1993.
- HOUSLEY, T.L.; KANABUS, J.; CARPITA, N.C. Fructan synthesis in wheat leaf blades. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 192-195, 1989.

- ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and developemnt in Japan. **Food Technology**, v. 47, p.126-135, 1993.
- JOHN, P. Fructan quality and fructan synthesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 569-572, 1991.
- JUNG, K.H.; KIM, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Production of high fructooligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose-oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 65-70, 1993.
- JUNG, G.H.; LIM, J.Y.; YOO, S.J.; LEE, J.H.; YOO, M.Y. Production of fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 703-708, 1987.
- JUNG, K.H.; YUN, J.W.; KANG, K.R.; LIM, J.Y.; LEE, J.H. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 11, p. 491-494, 1989
- KOHOMOTO, T.;FUKUI, F.; TANAKA, H.; MITSUOKA, T. Dose-response test of isomalto-oligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2157-2159, 1991.
- LEE, K.J.; CHOL, J.D.; LIM, J.Y. Characterization of extracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans* C-23. **Korea Journal of Microbiology**, v. 29, p. 310-306, 1991.
- LEE, K.J.; CHOL, J.D.; LIM, J.Y. Purification and properties of intracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 411-415, 1992.
- LINEWEAVER H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934
- LINGAPPA, Y.; SUSSMAN, A.S.; BERNSTEIN, I.A. Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans* (De By) Arn.

- (=*Pullularia pullulans*). **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 20, p. 109-128, 1963.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUND, B.M.; WYATT, G.M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v. 78, p. 331-336, 1973.
- MALLETTE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W., eds. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, 1969. v.1, p. 522-566.
- MANLEY-HARRIS, M.; RICHARDS, G.N. Formation of trisaccharides (kestoses) by pyrolysis of sucrose. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 101-113, 1991.
- McKELLAR, R.C.; MODLER, H.W. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 537-541, 1989.
- MODLER, H.W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.
- MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; GOFF, H.D.; MACKIE, D. Using ice cream as a mechanism to incorporate bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, p. 3-9, 1990a.
- MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, v. 23, p. 29-41, 1990b.
- MOWLL, J.L.; GADD, G.M. Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 279-284, 1984.

- MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1451-1454, 1992.
- MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1681-1685, 1993.
- MURAMATSU, M.; KAINUMA, S.; MIWA, T.; NAKAKUKI, T. Structures of some fructooligosaccharides produced from sucrose by mycelia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1303-1304, 1988.
- NILSSON, U.; BJORCK, I. Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1482-1486, 1988.
- NISHIZAWA, M.; MARUYAMA, Y.; NAKAMURA, M. Purification and characterization of invertase isozymes from *Fusarium oxysporum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 489-498, 1980.
- NELSON, J.M.; COHN, D.J. Invertase in honey. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 61, p. 193-224, 1924.
- ODA, Y.; OUCHI, K. Construction of a sucrose-fermenting bakers's yeast incapable of hydrolysing fructooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.495-498, 1991.
- OLIVEIRA, I.M.A.; PARK, Y.K. Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms for production of fructooligosaccharides and studies of some enzyme properties. **Revista de Microbiologia**, v. 26, p. 125-129, 1995.
- OHTSUKA, K.; HINO, S.; FUKUSHIMA, T.; OZAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683 **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 56, p. 1373-1377, 1992.
- OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a new sweetener "neosugar" in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1574-1581, 1984.

- ONISHI, N.; YAMASHIRO, A.; YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4022-4025, 1995.
- ONODERA, S.; SHIOMI, N. Purification and subsite affinities of exo-inulinase from *Penicillium trzebinskii*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1443-1447, 1992.
- PAPADAKIS, P.E. Further findings on invertase from honey. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 83, p. 561-568, 1929.
- PARK, Y.K.; ALMEIDA, M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 331-334, 1991.
- PARK, Y.K.; YIM, D.K.; PATORE, G.M. Conversion of sucrose by yeast β -fructofuranosidase. In: PROGRESS IN FOOD FERMENTATION, 1993, Valencia. **Proceeding of Seventh European Conference of Food Chemistry**. Valencia, 1993. p.223-228.
- PAZUR, J.H. Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 199, p. 217-225, 1952.
- PECHAK, D.G.; CRANG, R.E. An analysis of *Aureobasidium pullulans* developmental stages by means of scanning electron microscopy. **Mycologia**, v. 69, p. 783-792, 1977.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, 1985. 413p. (Food science and technology. A series of monographs).
- PSZCZOLA, D.E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. **Food Technology**, v. 42, p. 96-100, 1988.
- REESE, E.T.; BIRZGALIS, R.; MANDELS, F.W. Sucrases in fungi. **Canadian Journal of Biochemical Physiology**, v. 40, p. 272-283, 1962.

- REESE, E.T.; LOLA, J.E.; E PARRISH, F.W. Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases. **Journal of Bacteriology**, v. 100, p. 1151-1154, 1969.
- REESE, E.T.; MAGUIRE, A. *Aureobasidium pullulans* as a source of sucrase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 17, p. 329-332, 1971.
- SAUNDERS, R.M.; WALKER, H.G. The sugars of wheat bran. **Cereal Chemistry**, v. 46, p. 85-92, 1969.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Isolation and identification of fructooligosaccharides in roots of asparagus. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 567-575, 1976.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructooligosaccharides by asparagus fructosyl transferases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, p. 2233-2244, 1979.
- SHINOHARA, S. **Process for preparing fructooligosaccharose**. Int. Cl⁴ C 12 P A9/18. EP. n. 0188047A1. 18 jan. 1985; 23 jul. 1986.
- SILMAN, R.W.; BRYAN, W.L.; LEATHERS, T.D. A comparison of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 71, p. 65-70, 1990.
- SIMS, I.M.; SMOUTER, H.; POLLOCK, C.J.; SIMPSON, R.J. The separation of complex mixtures of fructo-oligosaccharides from plants **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 257-267, 1991.
- SMEEKENS, S.; ANGENENT, G.; EBSKAMP, M.; WEISBEEK, P. Molecular biology of fructan accumulation in plants. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p.565-569, 1991.
- SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V.H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.

- STRAATHOF, A.J.J.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM, H.V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, v. 146, p. 154-159, 1986.
- STONE-DORSHOW, T.; LEVITT, M.D. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 61-65, 1987.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (neosugar) on growth and gastrointestinal function of rat. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v. 32, p. 111-121, 1986.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharide (neosugar) in rats. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 553-559, 1989.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, p. 61-65, 1994.
- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.G. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.
- UHM, T.B.; JEON, D.Y.; BYUN, S.M.; HONG, J.S.; GROOTWASSINK J.W.D. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 926, p. 119-126, 1987.
- USAMI, S.; TAKASHI, I.; KIRIMURA, K.; UEHARA, K.; CHEN, J. Production of β -fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 303-305, 1991.
- VRIES, W.; GERBRANDY, J.; STOUTHAMER, A.H. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 136, p. 415-425, 1967.

- WAGNER, W.; WIEMKEN, A. Enzymology of fructan synthesis in grasses. **Plant Physiology**, v. 85, p. 706-710, 1987.
- WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Garungsferments Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384-421, 1941.
- WHITE, J.W.; MAHER, J. Transglucosidation by honey invertase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 42, p. 360-367, 1953.
- WHITE, L.M.; SECOR, G.E. The oligosaccharides formed during the sucrose-invertase reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 36, p. 490-491, 1952.
- WENHAM, D.G.; HENNESSEY, T.D.; COLE, J.A. Regulations of glucosyl- and fructosyl transferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, p. 117-124, 1979.
- WICKERHAM, L.J.; KURTZMAN, C.P. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v. 67, p. 343-361, 1975.
- YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKURA, M. Effects of fructooligosaccharides on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, v. 4, p. 961-966, 1984.
- YASUDA, H.; SHITOH, T.; YAMANO, T.; ITOH, Y; SHIMURA, S. Identification of neokestose produced from sucrose by an enzyme of *Penicillium oxalicum* **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 777-778, 1986.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cell of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 2, p. 98-101, 1992a.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; OH, J.W.; LEE, J.H. Semi batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 24/25, p. 299-308, 1990.

- YUN, J.W.; KANG, S.C.; SONG, S.K. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase. **Biotechnology Techniques**, v. 9, p.805-808, 1995.
- YUN, J.W.; LEE, M.G.; SONG, S.K. Batch production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructofuranosidase and glucose oxidase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 159-163, 1994a.
- YUN, J.W.; LEE, M.G.; SONG, S.K. Continuous production of isomaltoligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 1145-1150, 1994b
- YUN, J.W.; OH, K.K.; KIM, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Production of palatinose by immobilized cells of *Erwinia raphontici*. **Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 7, p. 79-83, 1992b.
- YUN, J.W.; SONG, S. K. The production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 573-576, 1993.
- ZIESENITZ, S.C.; SIEBERT, G. In vitro assessment of nystose as a sugar substitute. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 846-851, 1987.