



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp D12 E
ESTUDO DA CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE**

**Haroldo Yukio Kawaguti
Engenheiro de Alimentos**

**Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Haroldo Yukio Kawaguti** aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de abril de 2003.

Campinas, 02 de abril de 2003.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Helia Harumi Sato".

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do Título de Mestre
em Ciência de Alimentos.**

Campinas, São Paulo.

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	RE
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	K179p
V	EX
TOMBO BCI	53563
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/10/2003
Nº CPD	

CM00182272-1

31B 10 289743

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

K179p Kawaguti, Haroldo Yukio
Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose / Haroldo Yukio Kawaguti. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Glicosiltransferases. 2.Otimização. 3.Imobilização.
4.Bioreatores. I.Sato, Hélia Harumi. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida e aprovada em de de 2003, pela banca
examinadora constituída pelos professores:

Hélia Harumi Sato

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora

Gabriela Alves Macedo

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Membro

Terezinha de Jesus Garcia Salva

Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva

Membro

Prof. Dr. Yong Kun Park

Membro

89897800
00816868

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Kimiko Kawaguti e Hisao Kawaguti pelo incentivo e permanente apoio em todos estes anos.

Aos meus irmãos Carla Akimi Kawaguti e Hilário Hideo Kawaguti pelo companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pelo incentivo, paciência e orientação deste trabalho.

À Patrícia Makiyama pela amizade e companheirismo em todos estes anos.

A Eiric Manrich pelo companheirismo, auxílio e dedicação neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial a Alice Fujita, Cristina Lui, Daniela Orsi, Luciana Fleuri, Luciana Ferracini, Mariana Uenojo, Márcia Nitschke e Mareci.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Bia, Dora, Eliane e Guilherme.

Aos meus eternos amigos Anette Cavalcanti, Claudio Roethig, Luciana Yamamoto e Patrícia Castro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa Prodesa Produtos Especiais para Alimentos S/A pelo fornecimento do produto Prodex Lac SD®.

À empresa Corn Products Brasil pelo fornecimento da água de maceração de milho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
RESUMO.....	xxiii
SUMMARY.....	xxv
1.Introdução.....	1
2.Revisão Bibliográfica	5
2.1.Microrganismos produtores de glicosiltransferase capazes de converter sacarose em isomaltulose.....	5
2.2.Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas	10
2.3.Características e aplicações da isomaltulose	15
2.4.Isomalt® ou Palatinit®	20
3.Material e Métodos	23
3.1.Microrganismo	23
3.2.Manutenção do microrganismo.....	23
3.3.Estudo da otimização do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12	23
3.3.1.Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	24
3.3.1.1.Preparação do pré-inóculo.....	24
3.3.1.2.Fermentação.....	24
3.3.1.3.Determinação da atividade de glicosiltransferase.....	25
3.3.2.Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melaço de cana, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	25

3.4. Estudo da relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo 2 e produção de glicosiltransferase pela linhagem de <i>Erwinia</i> sp D 12, em fermentador de 5 litros a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C	26
3.4.1. Preparação do pré-inóculo.....	26
3.4.2. Fermentação em fermentador de 5 litros	26
3.4.3. Crescimento do microrganismo	27
3.5. Produção de massa celular de <i>Erwinia</i> sp D12 em fermentador	27
3.5.1. Preparação do pré-inóculo.....	27
3.5.2. Fermentação.....	28
3.6. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de <i>Erwinia</i> sp D 12, em processo em batelada	28
3.6.1. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre.....	28
3.6.2. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de <i>Erwinia</i> sp D12.....	29
3.6.3. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12 em alginato de cálcio	29
3.7. Estudo da imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp D12 em alginato de cálcio ..	30
3.7.1. Imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp D12, em diferentes alginatos de sódio, e conversão de sacarose em isomaltulose em processo em batelada.....	30
3.7.2. Imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp D12, em alginatos de sódio Synth e Sigma em diferentes concentrações, e conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator.....	31
3.7.3. Efeito da concentração de células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator	35

3.7.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12 em alginato de cálcio, em bioreator, com recirculação do substrato.....	39
4. Resultados e Discussão	43
4.1. Estudo da otimização do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12	43
4.1.1. Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melão de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®] (ELP) para produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12.....	43
4.1.2. Primeiro planejamento	43
4.1.3. Segundo planejamento	53
4.1.4. Terceiro planejamento	61
4.1.5. Quarto planejamento	71
4.2. Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melão de cana, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura Prodex Lac SD [®] (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12	77
4.2.1. Primeiro planejamento	77
4.2.2. Segundo planejamento	85
4.2.3. Terceiro planejamento	93
4.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo 2 e produção de glicosiltransferase pela linhagem de <i>Erwinia</i> sp D 12 em fermentador de 5 litros, a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C	101
4.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de <i>Erwinia</i> sp D 12, em processo em batelada	115
4.4.1. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre	115
4.4.2. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de <i>Erwinia</i> sp D12	116

4.5. Estudo da imobilização das células de <i>Erwinia</i> sp D12 em alginato de cálcio	117
4.5.1. Imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp D12, em diferentes alginatos de sódio e conversão de sacarose em isomaltulose, em processo em batelada.....	117
4.5.2. Imobilização de células de <i>Erwinia</i> sp D12, em alginatos de sódio Synth e Sigma, em diferentes concentrações e conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator.....	121
4.5.3. Efeito da concentração de células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator	125
4.5.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, em bioreator, com recirculação de substrato.....	129
5. Conclusões	135
6. Sugestões para trabalhos futuros	137
7. Referências Bibliográficas	139

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos produtores de glicosiltransferase e características operacionais da conversão de sacarose em isomaltulose.....	12
Tabela 2: Comparação da atividade e estabilidade de células de <i>Erwinia rhapontici</i> imobilizadas por diferentes métodos.....	13
Tabela 3: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.	45
Tabela 4: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.....	45
Tabela 5: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.....	46
Tabela 6: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.	47
Tabela 7: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.....	48
Tabela 8: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.....	54
Tabela 9: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana,	

peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.	54
Tabela 10: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.....	55
Tabela 11: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.	56
Tabela 12: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.....	57
Tabela 13: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.	62
Tabela 14: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.....	62
Tabela 15: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.....	64
Tabela 16: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.	65
Tabela 17: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac	

SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.	66
Tabela 18: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, ..	72
Tabela 19: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao quarto planejamento.....	72
Tabela 20: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao quarto planejamento.....	73
Tabela 21: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referente ao quarto planejamento.	74
Tabela 22: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.....	78
Tabela 23: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na produção de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.	78
Tabela 24: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD [®]) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento....	79
Tabela 25: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac	

SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.....	80
Tabela 26: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.....	81
Tabela 27: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.....	86
Tabela 28: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.	86
Tabela 29: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento. .	87
Tabela 30: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.....	88
Tabela 31: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.....	89
Tabela 32: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.....	94

Tabela 33: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.	94
Tabela 34: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.....	95
Tabela 35: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.....	96
Tabela 36: Custo do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12.....	100
Tabela 37: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(15 g/L), em fermentador de 5 L, a 24°C.	103
Tabela 38: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(15 g/L), em fermentador de 5 L, a 26°C.	105
Tabela 39: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de	109
Tabela 40: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de <i>Erwinia</i> sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L),	

peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 L, a 30°C.	111
Tabela 41: Produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp D12, em meio de cultivo 2 otimizado composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 litros, a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C.....	115
Tabela 42: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se enzima livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, em	117
Tabela 43: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (1,0%), em processo em batelada.....	119
Tabela 44: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (1,5%), em processo em batelada.....	119
Tabela 45: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (2,0%), em processo em batelada.....	119
Tabela 46: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de <i>Erwinia</i> sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Sigma 1,5% e Synth 1,5% e 2,0%, em bioreator.	123
Tabela 47: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de <i>Erwinia</i> sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Synth 2,0%, em bioreator.	127

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase 1
- Figura 2: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas com soluções de alginato de sódio Sigma 1,5%, alginato de sódio Synth 1,5% e alginato Synth 2,0%..... 33
- Figura 3: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se diferentes concentrações de células de *Erwinia* sp D12 nos grânulos de células imobilizadas em alginato de cálcio. 37
- Figura 4: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, e circulação do substrato sacarose 35,0% em circuito fechado. 41
- Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao primeiro planejamento..... 51
- Figura 6: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao segundo planejamento. 59
- Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da

concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD [®] , referente ao terceiro planejamento.....	69
Figura 8: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de Melaço de cana e Peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de Melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de Peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao quarto planejamento.	75
Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referentes ao primeiro planejamento.	83
Figura 10: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referentes ao segundo planejamento.	91
Figura 11: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referentes ao terceiro planejamento.	97
Figura 12: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 24°C.....	103

Figura 13: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 26°C.....	107
Figura 14: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 28°C.....	109
Figura 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 30°C.....	113
Figura 16: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas em diferentes concentrações e tipos de alginato de sódio, em processo em batelada.	121
Figura 17: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de <i>Erwinia</i> sp D12, em alginato de cálcio Sigma 1,5% e alginato de cálcio Synth 1,5% e 2,0%, em bioreator.....	125
Figura 18: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de <i>Erwinia</i> sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Synth 2,0%, em bioreator.....	129
Figura 19: Cromatografia líquida de alta eficiência dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pelas células de <i>Erwinia</i> sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio.	131

RESUMO

Isomaltulose é um dissacarídeo redutor, de baixo potencial cariogênico, utilizado comercialmente na produção de doces, confeitos e chocolates. A isomaltulose é obtida por conversão enzimática da sacarose e apresenta menor velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, quando comparada com a sacarose. A isomaltulose é utilizada na produção de isomalte, uma mistura de açúcar-álcool de baixo valor calórico e não cariogênico, obtido por hidrogenação e empregada na formulação de produtos dietéticos e farmacêuticos.

Neste trabalho, foi estudada a otimização do meio de cultivo de *Erwinia* sp D12 para a produção de glicosiltransferase, em frascos sob agitação, utilizando-se metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, testando-se os componentes melaço de cana, peptona bacteriológica (Biobrás) e extrato de levedura (Prodex Lac SD[®]). A maior produção de glicosiltransferase foi obtida em meio de cultivo 2 composto por melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica (Biobrás) (20 g/L) e extrato de levedura (Prodex Lac SD[®]) (15 g/L). Na fermentação da linhagem de *Erwinia* sp D12, neste meio de cultivo otimizado, em frascos sob agitação a 200 rpm, foi obtida 7,26 UA/mL após 15 horas de fermentação a 30°C, sendo que o custo deste meio de cultivo foi estimado em R\$ 7,06 por litro.

No estudo de otimização do meio de cultivo de *Erwinia* sp D12 para a produção de glicosiltransferase, em frascos sob agitação a 200 rpm, utilizando-se metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, testando-se os componentes melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura (Prodex Lac SD[®]), a maior produção de glicosiltransferase foi obtida em meio de cultivo 3 composto por melaço de cana (100 g/L), água de maceração de milho (60 g/L), extrato de levedura (Prodex Lac SD[®]) (8 g/L) e K₂HPO₄ (0,1 g/L). Na fermentação da linhagem de *Erwinia* sp D12, neste meio de cultivo otimizado, em frascos sob agitação, foi obtida 6,65 UA/mL após 15 horas de fermentação a 30°C, sendo que o custo deste meio de cultivo foi estimado em R\$ 0,20 por litro.

No estudo da relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D 12, em meio de cultivo 2 otimizado composto por melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica (Biobrás) (20 g/L) e extrato de levedura (Prodex Lac SD[®]) (15 g/L), em fermentador de 5 litros, nas temperaturas de 24°C, 26°C, 28°C e 30°C, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm, a maior atividade de glicosiltransferase foi 14,61 UA/mL de meio de cultivo após 10 horas de fermentação, a 26°C.

No estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se enzima livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de *Erwinia* sp D 12, em processo em batelada, foram obtidas maiores taxas de conversão utilizando-se células livres e células imobilizadas.

No estudo da imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em alginato de cálcio, verificou-se que a solução 1,0% de alginato de sódio da marca Sigma, de alta viscosidade, pode ser substituído por solução 2,0% de alginato de sódio da marca Synth, de menor custo. Utilizando-se suspensão 40,0% (massa celular úmida/volume) de células de *Erwinia* sp D12 e solução 2,0% de alginato de sódio da marca Synth, para a imobilização de células, foi obtida 74,18% de conversão da sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação, a 30°C.

SUMMARY

Isomaltulose is a reducing disaccharide, of low cariogenic potential, used commercially in the production of candies and chocolates. Isomaltulose is produced by enzymatic conversion of sucrose and presents lower hydrolysis and monosaccharides formation in the organism, when compared with sucrose. Isomaltulose is used in the production of isomalte, a sugar-alcohol mixture of low caloric value that is not cariogenic and find application in to dietetics and pharmaceutical products.

The optimization of culture medium for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp D12, in shake flasks, was studied using experimental design methodology and surface response analysis. The medium components tested were sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract. The highest glucosyltransferase production was reached in culture medium 2 composed of 160 g/L of sugar cane molasses, 20 g/L of bacteriological peptone and 15 g/L of yeast extract. The cultivation of *Erwinia* sp D12 using the optimized medium under agitation at 30°C showed enzyme activity of 7,26 AU/mL after 15 hours, with estimated cost for the medium of R\$ 7,06 per liter.

A second medium optimization study was conducted using sugar cane molasses, corn steep liquor and yeast extract. The culture medium 3 composition that showed highest glucosyltransferase production was composed of 100 g/L of sugar cane molasses, 60 g/L of corn steep liquor, 8 g/L of yeast extract and 0,1 g/L of K_2HPO_4 after 15 hours of cultivation at 30°C, the enzyme activity on this medium was 6,65 AU/mL with the estimated medium cost around R\$ 0,20 per liter.

The relationship between fermentation time, growth of microorganism, change of medium pH and glucosyltransferase production was studied using 5 liters fermentation vessel, with culture medium 2 composed of 160 g/L of sugar cane molasses, 20 g/L of bacteriological peptone and 15 g/L of yeast extract, at 24°C, 26°C, 28°C and 30°C. The highest enzyme activity, 14,61 AU/mL, was reached after 10 hours, at 26°C.

The conversion of sucrose to isomaltulose, using free enzyme and also immobilized and free cells of *Erwinia* sp D12, was evaluated. The conversion rates were highest for free and immobilized cells.

In the study of the immobilization of *Erwinia* sp D12 cells in calcium alginate, was verified that 1,0% sodium alginate solution (Sigma), that showed high viscosity, can be substituted to 2,0% sodium alginate solution (Synth) with lower cost. Using 40,0% cell suspension of *Erwinia* sp D12 and 2,0% sodium alginate solution for cell immobilization, the conversion rate from sucrose to isomaltulose was 74,18%, after 24 hours, at 30°C

1.Introdução

O interesse pela produção de açúcares alternativos tem aumentado nos últimos anos e é de grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica.

A isomaltulose ou palatinose[®] é um açúcar de baixo potencial cariogênico, obtido comercialmente por conversão enzimática da sacarose catalisada por glicosiltransferase microbiana como mostra a Figura 1.

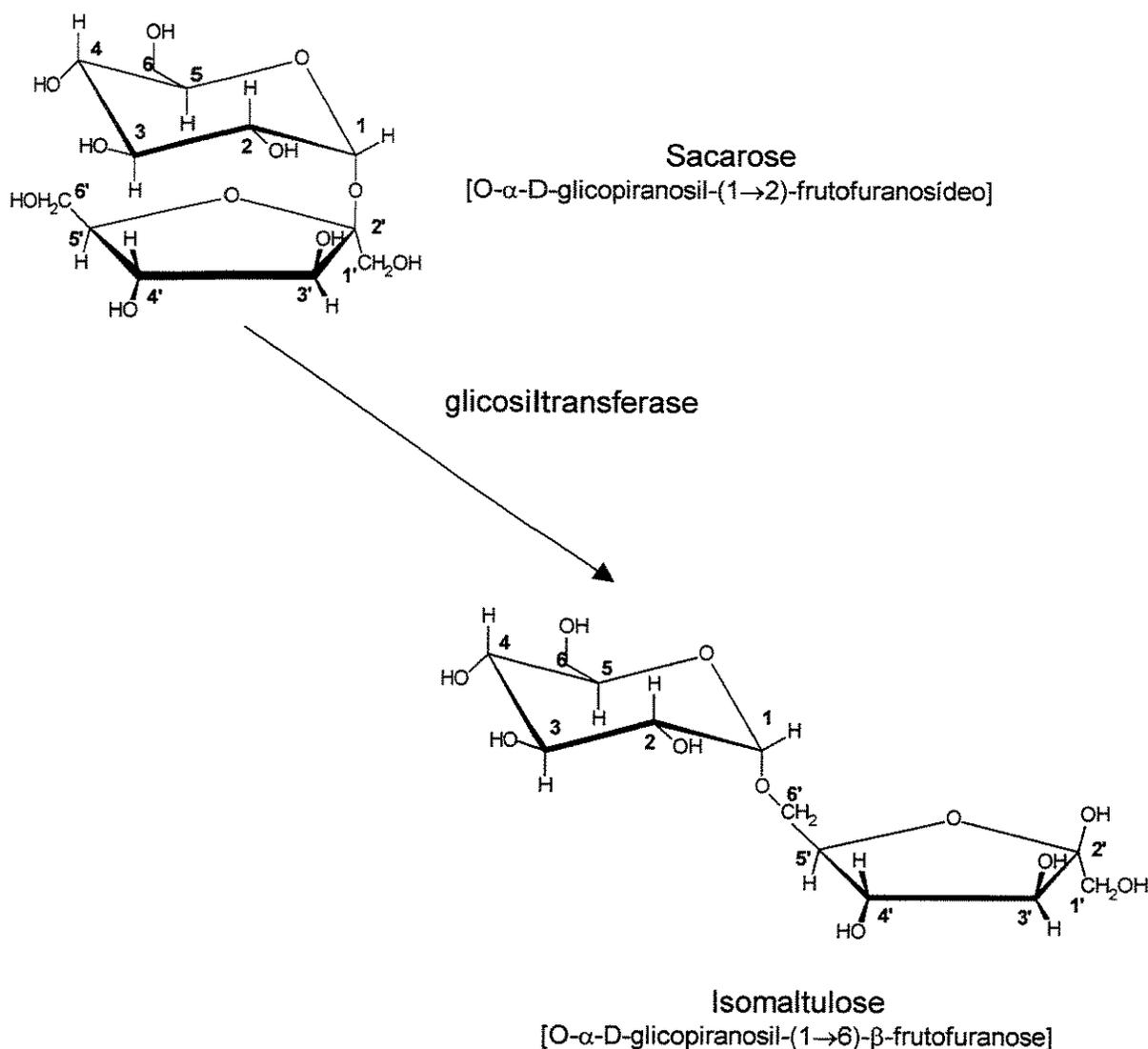


Figura 1: Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase

A conversão de sacarose em isomaltulose pode ser realizada em sistemas de enzima livre (Lund e Wyatt, 1973; McAllister et al., 1990; Park et al., 1992; Park et al., 1996), células livres (Schiweck et al., 1973; Heikkila, 2000) e células imobilizadas (Bucke et al., 1982; Cheetham et al., 1982; Lantero, 1982; Shimizu et al., 1982; Cheetham et al., 1985; Hashimoto et al., 1987; Tsuyuki, 1992; Sarkki et al., 1999; Moraes, 2002).

Os principais microrganismos produtores de glicosiltransferase capazes de converter sacarose em isomaltulose, descritos na literatura, são *Protaminobacter rubrum* (Hashimoto et al., 1987; Tsuyuki et al., 1992; Kakinuma et al., 1998; Sarkki et al., 1999), *Erwinia carotovora* (Lund et al., 1973), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1982 e 1985), *Serratia plymuthica* (McAllister et al., 1990; Véronèse e Perlot, 1999), *Klebsiela planticola* (Huang et al., 1998) e *Klebsiela sp* (Park et al., 1992; Park et al., 1996).

O interesse pela isomaltulose se deve ao baixo potencial cariogênico, baixa velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, e também, devido à possibilidade de conversão deste açúcar a uma mistura de açúcar-álcool, de baixo valor calórico e não cariogênico, conhecido como Isomalt® ou Palatinit®.

A isomaltulose é significativamente menos cariogênica do que a sacarose. Em estudos com animais (Ooshima et al., 1983; Sasaki et al., 1985) e em seres humanos (Topitsoglou et al., 1984) demonstraram-se que a produção de ácidos e glucana insolúvel por linhagens de *Streptococcus mutans*, a partir de isomaltulose, é muito baixa quando comparada com a sacarose.

A isomaltulose apresenta cerca de 50% da doçura da sacarose (Shimizu et al., 1982; Takazoe, 1985; Takazoe et al., 1985b; Hashimoto et al., 1987; Godshall, 1997; Huang et al., 1998) e propriedades físicas e organolépticas muito similares às da sacarose (Cheetham et al., 1982; Takazoe, 1989; Huang, 1998). A solubilidade da isomaltulose é aproximadamente metade da sacarose, o que facilita a sua separação na etapa de cristalização. Quando utilizada, em alimentos, como substituto da sacarose em balas e chocolates, não foram notadas diferenças na doçura (Takazoe, 1989).

No organismo a isomaltulose é hidrolisada por isomaltase e absorvida como glicose e frutose (Takazoe et al., 1985b). Porém, a velocidade de hidrólise e a absorção são menores do que a da sacarose. A isomaltulose tem sido recomendada como nutriente parenteral potencial para diabéticos e não diabéticos (Kawai et al., 1985; Kawai et al., 1989; Takazoe, 1989). A isomaltulose, em estudos feitos com animais, não mostrou efeito teratogênico, mutagênico ou qualquer tipo de toxicidade, sendo segura para a utilização em alimentos (Takazoe 1989, Lina et al., 1997).

Este trabalho visou à formulação de meio de cultivo de baixo custo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se a glicosiltransferase microbiana.

2.Revisão Bibliográfica

2.1.Microrganismos produtores de glicosiltransferase capazes de converter sacarose em isomaltulose

Weidenhagen e Lorenz (citado por Lund e Wyatt, 1973) descreveram a conversão de sacarose em isomaltulose, com rendimento de 90%, por ação da bactéria *Protaminobacter rubrum* isolada de açúcar de beterraba.

Lund e Wyatt (1973) relataram que uma linhagem de *Erwinia carotovora* var. atroseptica GI 20, cultivada em meio contendo peptona 1,0% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v) e sacarose 4,0% (p/v), durante 3 dias em frascos Erlenmeyers sob agitação a 25°C, converteu sacarose em isomaltulose e 1-O- α -D-glicosil-frutose. Após cromatografia em papel, a isomaltulose apresentou coloração verde-amarela, característica de oligossacarídeos que apresentam ligação glicosídica α -1,6.

Schiweck et al. (1973) estudaram a conversão enzimática de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica*. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 e, após 24 horas de incubação a 20°C-30°C sob agitação constante, o meio de cultivo foi adicionado a uma solução de 4,0 Kg de sacarose em 16,0 Kg de água. A mistura foi aerada, agitada e o pH mantido em 7,0. Após 12 horas de incubação, a massa celular foi separada da solução e reutilizada aproximadamente seis vezes em condições estéreis. Durante a reação formaram-se isomaltulose, frutose e glicose. Foi obtido um rendimento de 900,0-950,0 g de isomaltulose.

McAllister et al. (1990) descreveram a produção e caracterização de uma enzima intracelular, de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, capaz de produzir isomaltulose a partir de sacarose. A produção máxima da enzima ocorreu após 16 horas de fermentação a 30°C. A enzima bruta foi obtida após centrifugação a 10.000 rpm, por 20 minutos e rompimento da massa celular em prensa-X. A glicosiltransferase obtida foi purificada 25 vezes em coluna Bio-Gel. A enzima

purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 30°. Através da análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) observou-se que a conversão de isomaltulose foi de 85,0%, após 10 minutos de reação em solução de sacarose 5,0% (p/v) em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 e, após 1 hora, com solução de sacarose 10% (p/v). A eficiência da conversão de uma solução de sacarose 40% (p/v), após 3 horas de reação, foi de 87,0%.

Park et al. (1992) relataram o isolamento de uma linhagem de *Klebsiella* sp K18, produtora de glicosiltransferase intracelular, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose. O microrganismo foi cultivado em meio de cultivo contendo sacarose 4,0% (p/v), peptona 1,0% (p/v) e extrato de carne 0,4% (p/v), durante 24-48 horas a 30°C. A massa celular foi obtida por centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 5°C. A massa celular, lavada três vezes com água destilada, foi ressuspensa em água destilada e tratada em ultrasonicador a 180 watts, por 2 minutos, para extração da glicosiltransferase. A enzima purificada apresentou atividade ótima a 35°C e na faixa de pH 6,0 a 6,5. A enzima converteu solução sacarose 4,0% (p/v) em isomaltulose com uma eficiência de 86,0%, a 25°C e pH 6,5.

Uekane (1993) estudou a produção e a caracterização bioquímica de glicosiltransferase intracelular de *Klebsiella* sp K18. A produção de glicosiltransferase foi realizada em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo constituído de peptona 1,0% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v) e sacarose 4,0% (p/v), em pH ajustado a 6,5. Na fermentação a 30°C, a enzima atingiu a atividade máxima de 0,167 unidades/mL de meio de cultivo após 24 horas. A glicosiltransferase purificada apresentou atividade ótima a 35°C e na faixa de pH 6,0 a 6,6. O tratamento térmico da enzima purificada durante 1 hora a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C resultaram em 5,3%, 10,5%, 13,2%, 15,8%, 18,4%, 31,6%, 92,1% e 100% de inativação, respectivamente. A conversão máxima da sacarose em isomaltulose foi de 86% quando a enzima foi incubada em solução de sacarose 4,0% (p/v) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,5, durante 64 horas a 25°C.

Nagai et al. (1994) purificaram uma α -glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. O pH ótimo e a temperatura ótima de atividade da enzima foram 5,8 e 40°C, respectivamente. A enzima apresentou maior estabilidade na faixa de pH 5,1 a 6,7 e em temperaturas inferiores a 40°C. A enzima purificada converteu sacarose em trealulose e isomaltulose, e a razão entre trealulose e isomaltulose aumentou a temperaturas mais baixas. Realizou-se estudo em fermentador de 5 litros contendo 3 L de meio composto de peptona 10,0 g/L, extrato de carne 3,0 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L, melão 100,0 g/L, NaCl 3,0 g/L, Na₂HPO₄.12H₂O 3,0 g/L, ajustado a pH 7,0. Manteve-se o meio de cultivo a 28°C, durante 48 horas, a uma taxa de aeração de 1 vvm e agitação de 380 rpm. A conversão de sacarose para isomaltulose e trealulose foi de aproximadamente 9,0% e 91,0%, respectivamente.

Park et al. (1996) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose por uma glicosiltransferase intracelular proveniente de uma linhagem de *Klebsiella sp.* O microrganismo foi inoculado em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultivo composto de peptona 1,0% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v), sacarose 4,0% (p/v) e incubado por 2 dia, a 25°C e a 200 rpm. Em seguida, o meio de cultivo foi centrifugado e as células foram lavadas três vezes com água deionizada e centrifugadas. Para a obtenção de enzima bruta, as células foram ressuspendidas em 10 mL de tampão citrato-fosfato, 0,1 M, pH 6,0 e lisadas por sonicação a 40 khz, durante 45 segundos. A glicosiltransferase purificada mostrou atividade ótima na faixa de pH 6,0 e 6,5, a 35°C. A enzima converteu sacarose 4,0% (p/v) em isomaltulose após 64 horas de incubação, com uma eficiência de 86,0%, a 25°C e pH 6,5.

Huang et al. (1998) descreveram a conversão da sacarose em isomaltulose e trealulose pela bactéria *Klebsiella planticola* CCRC 19112. Para o cultivo do microrganismo, alíquotas de 2 mL de pré-inóculo foram transferidas para frascos de 500 mL com meio de cultivo ajustado para pH 7,0. Os frascos foram incubados a 30°C, em agitador rotatório, a 125 rpm. A produção máxima da enzima pelo microrganismo foi verificada entre 16-18 horas de fermentação. Os autores verificaram que a enzima encontrava-se no espaço periplasmático ou ligada à

membrana plasmática. Através de cromatografia e espectroscopia-IR, os autores verificaram que a enzima denominada isomaltulose sintase, convertia sacarose em isomaltulose (76,0%-84,0%), trealulose (14,0%-16,0%) e traços de glicose (2,0%-6,0%) e frutose (2,0%-3,0%).

Kakinuma et al. (1998) estudaram o modo de ação da enzima α -glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum*. A enzima catalisava a transglicosilação intramolecular da sacarose formando isomaltulose e também a transglicosilação intermolecular da sacarose, para outros aceptores, formando outros derivados de sacarose.

Celestino (1998) estudou a produção, purificação e a caracterização bioquímica da glicosiltransferase intracelular de *Erwinia* sp D12. No estudo da produção da glicosiltransferase, em fermentador de 2 litros, verificou-se que a enzima é produzida na fase exponencial de crescimento, sendo que a produção máxima foi obtida após 3 horas de fermentação a 28°C, e após 4 horas de incubação a 30°C e 35°C. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C. A glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 purificada mostrou-se termossensível, sendo inativada após 1 hora de tratamento a temperaturas superiores a 39°C e após 3 horas, a 35°C na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3, após 24 horas de incubação a 5°C. Utilizando-se a glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e solução de sacarose 5,0% e 10,0% (p/v) foram obtidos rendimentos de 73,5% e 72,3% de isomaltulose, respectivamente, após 4 horas de reação a 40°C.

Véronèse e Perlot (1999) descreveram a conversão de sacarose por α -glicosiltransferase de *Serratia plymutica* ATCC 15928. A enzima purificada converteu sacarose em isomaltulose, trealulose, glicose e frutose, sendo que a isomaltulose foi obtida em maior quantidade. O microrganismo foi cultivado em fermentador de 2 litros contendo 1,5 L de meio composto de sacarose 50,0 g/L, KH_2PO_4 5,0 g/L, MgSO_4 0,4 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L, extrato de levedura 7,5 g/L, por 20 horas, com uma taxa de aeração de 1 vvm, a 600 rpm. A glicosiltransferase foi obtida pelo rompimento celular em sonicador. O sobrenadante contendo a enzima foi obtido por centrifugação a 20.000 rpm, durante 30 minutos. A produção

máxima da enzima ocorreu após 20 horas de fermentação. A conversão máxima de solução de sacarose 292 mM ocorreu em pH 6,2 e a temperatura de 30°C, mas a proporção dos produtos foi dependente da temperatura de reação.

Heikkilä et al. (2000) descreveram a conversão enzimática de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77. A isomaltulose foi posteriormente convertida em isomalte. Para o cultivo do microrganismo foi preparado um pré-inóculo. Aliquotas de 0,4-0,6 mL de suspensão celular foram inoculadas em frascos contendo 300 mL de meio de cultivo composto de peptona 1,0% (p/v), extrato de carne 0,6% (p/v), sacarose 6,0% (p/v), 0,01 M de KH_2PO_4 , ajustado a pH 7,0, incubados a 230 rpm por 24 horas, a 30°C. Foram transferidos 1.200 mL, deste meio fermentado, para fermentador contendo 8,5 L de meio nutriente composto de sacarose 7,0% (p/v), água de maceração de milho 4,0% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,9% (p/v). A fermentação foi realizada a 30°C, a pH 6,0-7,0 e a 350 rpm, com uma taxa de aeração de 12 L/min. Todo o caldo de fermentação foi transferido para fermentador, com capacidade de 1.500 litros, contendo 1.100 L de meio nutriente citado anteriormente. A fermentação foi realizada a 30°C, com uma taxa de aeração de 1.100 L/min e a 350 rpm. Para a conversão de sacarose em isomaltulose o caldo de fermentação, contendo *Protaminobacter rubrum*, foi adicionado à solução de melaço de beterraba. A mistura foi incubada a 30°C com uma aeração de 1.500 L/min e a 200 rpm. Após 25 horas, a sacarose do melaço foi convertida em 82,0% de isomaltulose, 8,8% de trealulose, 3,3% de frutose, 2,0% de glicose e 3,9% de oligossacarídeos.

Moraes (2002) estudou a produção de glicosiltransferase por *Erwinia* sp D12, em frascos Erlenmeyers sob agitação, utilizando concentrações variadas de sacarose ou melaço de cana (0%-20,0%) como fonte de carbono e de peptona (0%-10,0%) como fonte de nitrogênio. A maior atividade, 12,8 UA/mL de meio de cultivo, foi obtida em meio de cultivo contendo melaço 12,0% (p/v), peptona 4,0% (p/v) e extrato de carne 0,4% (p/v), após 15 horas de fermentação a 30°C. No estudo em fermentador de 3 litros foi obtida maior atividade de glicosiltransferase, 15,6 UA/mL de meio de cultivo, na fase exponencial de crescimento, após 8 horas

de fermentação a 30°C. Fermentações em temperaturas acima de 32°C ou abaixo de 28°C diminuíram a atividade de glicosiltransferase. O pH do meio de fermentação manteve-se entre 5,5 e 6,5 em todas as temperaturas.

2.2. Conversão enzimática de sacarose em isomaltulose por células imobilizadas

As vantagens das células imobilizadas sobre as células livres são: incremento da estabilidade biológica; alta concentração de biomassa; melhora da transferência de massa; vantagens relacionadas aos efeitos de divisão celular; aumento do rendimento dos produtos; aumento da estabilidade dos produtos; vantagens devido à proximidade das células; aumento da seletividade da reação e versatilidade na escolha do reator (Dervakos e Webb, 1991).

A imobilização de células microbianas em uma alta densidade não só melhora a produtividade de um bioreator, mas também fornece muitos benefícios em relação às células livres. As células imobilizadas em matriz hidrogel podem ser protegidas de condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos e outros compostos capazes de inativá-las. Células imobilizadas também podem ser retidas e recuperadas mais facilmente de uma solução. Processos contínuos podem ser operados com uma alta concentração de células sem a perda de células microbianas mesmo em altos valores de diluição, o que resulta em um bioreator com maior produtividade (Park e Chang, 2000).

Shimizu et al. (1982) relataram um método de imobilização de células de *Serratia plymutica* para a conversão de sacarose em isomaltulose. As células foram imobilizadas em gel de alginato de cálcio. Os grânulos, contendo as células imobilizadas, foram adicionados em solução de polietilenoimina e, em seguida, tratados com solução de glutaraldeído por 30 minutos, a 25°C. Para cada ensaio, 30,0 g de grânulos foram adicionados a 100,0 g de solução de sacarose 33,0% (p/p) e, após 2 horas, mediu-se a conversão. Os grânulos foram recuperados e lavados com água destilada. A conversão manteve-se constante, cerca de 25%, quando os grânulos foram tratados com polietilenoimina 1,0% (p/v) e glutaraldeído

0,5% (p/v). Os autores obtiveram 80,0-90,0% de conversão da sacarose em isomaltulose após 24 horas.

Cheetham et al. (1982) estudaram a obtenção de isomaltulose a partir de células livres, enzimas livres e células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* (NCPB 1578 e ATCC 29263). Os microrganismos foram cultivados, em frascos sob agitação, a 30°C e as células coletadas por centrifugação a 23.000 x g, por 20 minutos. Uma suspensão celular 20,0% (p/v) foi imobilizada em alginato de cálcio formando grânulos de aproximadamente 5 mm de diâmetro. Os grânulos foram empacotados em colunas, a 30°C, e as colunas foram alimentadas com uma solução de sacarose 1,6 M, ajustada a pH 7,0. A estabilidade das células imobilizadas foi muito maior do que a da enzima livre extraída das células ou do que a das células livres, obtendo-se uma meia-vida de 8.625 horas, com 99,0% de conversão a partir de uma solução de sacarose 1,6 M.

Bucke et al. (1982) estudaram a obtenção de isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia rhapontici* (NCPB 1578 e ATCC 29283) imobilizadas em gel de alginato de cálcio. Para a fermentação, em frascos Erlenmeyers sob agitação a 120 rpm, por 70 horas a 30°C, alíquotas de 0,10 mL foram usadas para inocular 200 mL de meio composto de peptona de caseína 1,0% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v), sacarose 4,0% (p/v). Das técnicas utilizadas, a imobilização em gel de alginato de cálcio foi a mais eficiente. A massa celular na concentração 20,0% (peso úmido/volume) foi ressuspensa em uma solução de alginato de sódio 5,0% (p/v). A suspensão foi gotejada, de uma altura de aproximadamente 10 cm, em uma solução agitada de cloreto de cálcio 0,1 M, mantida a 30°C. Os grânulos foram agitados por 1 hora e depois empacotados em coluna (30 cm de altura e 5 cm de diâmetro). A estabilidade, medida em meia vida, das células imobilizadas aumentou com o aumento da concentração de sacarose empregada, assim como a concentração de isomaltulose no líquido convertido. A solução de sacarose 55,0% (p/v), ajustada a pH 7,0, foi bombeada em fluxo ascendente, mantida a 30°C e com valor de fluxo de sacarose de cerca de 0,01 volumes de coluna vazia/hora. A atividade das células imobilizadas foi cerca de 0,2 g de produto/g de células/h. A estabilidade das células foi de aproximadamente 8.500 horas.

Cheetham et al. (1985) descreveram a obtenção de isomaltulose a partir de sacarose utilizando células imobilizadas de *Serratia marcescens*, *Protaminobacter rubrum* e de três linhagens de *Erwinia rhapontici* em gel de alginato de cálcio. Embora as linhagens de *Serratia marcescens* e *Protaminobacter rubrum* tenham apresentado maior velocidade inicial de conversão, esta última apresentou formação de pigmento, enquanto que a primeira não era segura para uso em grande escala. Contudo, as linhagens de *Erwinia rhapontici* mostraram-se mais adequadas, devido à maior estabilidade quando utilizadas continuamente na forma imobilizada (Tabela 1). A enzima responsável pela conversão da isomaltulose se localizava no espaço periplasmático das células. Foram testadas várias técnicas de imobilização celular de *Erwinia rhapontici*: alginato de cálcio, DEAE-celulose, poliácridamida, κ -carragena e ágar. Todas as técnicas foram significativamente menos estáveis do que a do alginato que apresentou atividade 0,325 g de produto/g de massa celular úmida/h, meia-vida de 8.500 h e conversão de 99% da solução de sacarose (Tabela 2). A imobilização das células, com alginato, mostrou-se vantajosa, sendo um método simples e econômico.

Tabela 1: Microrganismos produtores de glicosiltransferase e características operacionais da conversão de sacarose em isomaltulose.

Linhagens	Atividade Inicial (g de produto/g peso úmido/h)	Estabilidade (meia-vida,h)	Conversão (%)
<i>Erwinia rhapontici</i> NCPPB 1578	0,441	1507	52,0
<i>Erwinia rhapontici</i> NCPPB 139	0,390	1877	54,0
<i>Erwinia rhapontici</i> NCPPB 1739	0,350	1840	52,0
<i>Serratia marcescens</i> NCIB 8285	0,648	121	51,0
<i>Protaminobacter rubrum</i> CB574.77	0,605	700	25,0

(Cheetham et al., 1985)

Tabela 2: Comparação da atividade e estabilidade de células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas por diferentes métodos.

Técnicas de Imobilização	Atividade (g produto/g células úmida/h)	Meia-Vida (h)	Conversão (%)
Alginato de cálcio	0,325	8.500	99,0
DEAE celulose	0,583	400	87,0
Poliacrilamida	0,130	570	50,0
Células agregadas com Glutaraldeído	0,153	40	23,5
κ-carragena	0,263	38	38,0
Carvão animal	0,010	25	25,0
Agar	0,340	27	27,0
Goma xantana	0,100	8	39,5

(Cheetham et al., 1985)

Hashimoto et al. (1987) relataram um método de obtenção de isomaltulose utilizando células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, e ao invés de sacarose, empregou-se 6-cloro-6-dioxisacarose. As células foram imobilizadas em gel de alginato de cálcio. A atividade máxima das células imobilizadas, em pH 5,5, ocorreu em 3 horas e foi proporcional a quantidade de células, sendo obtido conversão de 18,0%, 30,0% e 44,0% para 10, 20 e 40 mg de células/mL de solução, respectivamente.

Takazoe (1989) estudou a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando as linhagens de *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica*. As células foram imobilizadas em solução de alginato de cálcio. Os grânulos foram tratados com solução de polietilenoimina por 5 minutos e, posteriormente, com solução 0,5% (p/v) de glutaraldeído, a 5°C, por 30 minutos. O tratamento com polietilenoimina seguido de glutaraldeído estabilizou a enzima imobilizada. A atividade da α -glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum* foi considerada mais

estável do que a de *Serratia plymuthica*. A meia-vida das enzimas imobilizadas foi estimada em 73 e 23 dias, respectivamente, após sucessivas reações a 25°C. A linhagem de *Protaminobacter rubrum* foi selecionada para a conversão de sacarose em isomaltulose. O pH ótimo para a enzima imobilizada foi de 5,5. Os autores verificaram que não era conveniente utilizar temperaturas acima de 30°C. A eficiência da enzima diminuiu com o aumento do valor de Brix da solução de sacarose. Para a conversão, a solução de sacarose 40°Brix foi ajustada a pH 5,5 e aplicada em coluna de células imobilizadas, com fluxo controlado, mantendo-se uma concentração residual de sacarose efluente abaixo de 0,8% (p/p). Deste modo mais de 85,0% da sacarose foi convertida em isomaltulose, com formação de pequenas quantidades de 1-O- α -D-glicosil-D-frutose, isomaltose, isomelezitose, frutose e glicose.

Tsuyuki et al. (1992) isolaram a bactéria *Klebsiella planticola* MX-10 produtora de α -glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose e trealulose. Os autores estudaram a fermentação em frascos Erlenmeyers sob agitação e em fermentador, no qual empregou-se melaço 10,0% (p/v) no lugar da sacarose e antiespumante 0,03% (p/v). A fermentação foi realizada a 30°C, por 16,5 horas, com aeração de ¼ vvm. As células foram recuperadas por centrifugação a 15.000 x g, por 30 minutos, a 5°C e ressuspensas em solução 4,0% (p/v) de alginato de sódio. Esta mistura foi adicionada em uma solução de cloreto de cálcio para imobilização das células. Após 1 hora, os grânulos foram lavados com água e misturados com o mesmo volume de polietilenoimina, em pH 5,6, por 5 minutos. Posteriormente, os grânulos foram tratados com solução de glutaraldeído a 5°C e agitados por 20 minutos. Em seguida as células imobilizadas foram lavadas com água. A α -glicosiltransferase apresentou atividade máxima após 10 horas de fermentação e converteu cerca de 98,0% da sacarose, obtendo-se 65,4% de isomaltulose, 29,7% de trealulose e traços de glicose e frutose.

Sarkki et al. (1999) descreveram a imobilização de *Protoaminobacter rubrum* CBS 574.77 em DEAE-celulose para conversão de sacarose em isomaltulose. As células foram suspensas em 10 mL de solução salina e alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em frascos de 1.000 mL, contendo 300 mL

de meio ajustado a pH 7,0. Os frascos foram incubados a 230 rpm por 20 horas, a 30°C. Para a imobilização da bactéria na resina trocadora aniônica, 750 mL de suspensão contendo as células foram bombeadas na coluna a uma vazão de 35 mL/h, a 25°C. Uma solução de sacarose 25,0% (p/v), pH 7,5 e 30°C foi bombeada continuamente na parte inferior da coluna. Este sistema permitiu a saída de CO₂, proveniente da conversão, pela parte superior da coluna. O sistema foi mantido em operação por duas semanas, sendo que a conversão diminuiu com o tempo. O sistema foi renovado pela adição de meio de cultivo esterilizado. Após a conversão foi obtido 79,0% isomaltulose, 0,9% de trealulose, 0,9% de frutose, 0,4% de glicose e 18,5% de sacarose.

Moraes (2002) avaliou o rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose utilizando células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio. Estudou-se o efeito da temperatura (25°C-35°C) e da concentração de substrato (12,5%-60%). Foi obtido um rendimento em torno de 50% de isomaltulose, com soluções de sacarose entre 20%-30% (p/v) a 35°C. Concentrações de sacarose em excesso, ao redor de 40%, afetaram a atividade da célula imobilizada, diminuindo a conversão de sacarose em isomaltulose. O xarope obtido da conversão enzimática da sacarose em isomaltulose, pelas células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas, foi purificado através de cromatografia de troca iônica e o eluído foi cristalizado por abaixamento de temperatura. Os cristais obtidos apresentaram 91,4% de isomaltulose.

2.3.Características e aplicações da isomaltulose

A isomaltulose [O- α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-frutofuranose] é um dissacarídeo redutor produzido comercialmente a partir da conversão enzimática da sacarose (Sasaki et al., 1985; Takazoe, 1985a; Takazoe et al., 1985; Moynihan, 1998) e encontrado em pequenas quantidades no mel e em caldo de cana (Shimizu et al., 1982; Takazoe, 1985; Havenaar, 1987; Huang et al., 1998).

A produção mundial de isomaltulose, em 1998, foi estimada em 35.000 toneladas e o seu preço internacional atingiu aproximadamente US\$ 2/Kg.

Posteriormente, a produção mundial em 2001 foi de 50.000 toneladas, mantendo o preço de mercado (Lichtenhaler, 2002).

A isomaltulose possui cerca de 50% da doçura da sacarose. A ação inicial do adoçante é percebida mais rapidamente, uma forte doçura similar ao da sacarose persiste e no estágio final há um sabor residual mais fraco se comparado ao da sacarose. Não há sabor estranho (Takazoe, 1989).

A isomaltulose é menos termoestável do que a sacarose. O seu ponto de fusão é de 122°C-123°C, menor do que a da sacarose que é de aproximadamente 182°C (Cheetham et al., 1984; Takazoe, 1989).

A solubilidade da isomaltulose é aproximadamente metade da sacarose e a viscosidade, na mesma concentração, é ligeiramente menor. A isomaltulose não possui higroscopicidade como a sacarose e a lactose, não aumentando com adição de ácido cítrico, nem havendo inversão, como ocorre com a sacarose. Em bebidas e pães acidificados contendo sacarose e isomaltulose, esta última permanece intacta. Esta propriedade certamente facilita a manutenção da doçura e sabor em alimentos e bebidas acidificados (Takazoe, 1989).

A isomaltulose não é fermentada pela maioria das bactérias e leveduras. A isomaltulose não é fermentada pela bactéria *Streptococcus mutans*, principal microrganismo envolvido na formação de cáries, principalmente na presença de sacarose. A bactéria possui um complexo multienzimático que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. A glicosiltransferase do complexo enzimático une unidades de glicose formando glucana insolúvel em água, a qual pode formar, eventualmente, a base para a placa dentária matriz. Numa terceira fase de ação do complexo enzimático, a enzima responsável pela aderência fixa glucana (dextrana) na superfície lisa dos tecidos dos dentes, formando placas matrizes dentárias (Linke, 1987).

Muitos estudos relacionados ao potencial não-cariogênico da isomaltulose têm sido feitos, como a produção de ácidos, síntese de poliglucana em sistema modelo e a cariogenicidade em animais e em seres humanos.

Ooshima et al. (1983) verificaram em ratos a cariogenicidade de dietas contendo sacarose e/ou isomaltulose em proporções variadas. Linhagens de

Streptococcus mutans foram utilizadas para infectar e induzir cáries. Foi verificado que nos ratos alimentados somente com isomaltulose houve níveis basais de acúmulo de placa e incidência de cáries, enquanto que nos alimentados somente com sacarose houve formação de placa e alta incidência de cáries. Dietas com substituição de 50,0% de sacarose por isomaltulose resultaram numa redução de cerca de 70,0% do nível de cáries em relação à dieta de sacarose.

Topitsoglou et al. (1984) estudaram o efeito de freqüentes enxágües da boca, com solução de isomaltulose, na produção de ácido em placa dentária humana. Dezoito voluntários fizeram o enxágüe bucal por seis semanas, seis vezes ao dia, com solução contendo isomaltulose 15,0% (p/v) ou glicose 15,0% (p/v). Foram analisadas amostras da placa dentária e concluiu-se que a produção de ácido foi menor quando houve enxágüe com solução de isomaltulose.

Takazoe et al. (1985b) relataram que o adoçante preparado pela adição de isomaltulose em sacarose foi menos cariogênico, e que isomaltulose não foi somente menos cariogênico, mas também inibiu a formação de glucana insolúvel, a partir da sacarose, na cavidade oral. Nenhum ácido foi produzido utilizando-se isomaltulose em contato com *Streptococcus mutans* JC-2. A formação de ácido láctico a partir de isomaltulose foi muito inferior em relação a outros açúcares. Testes sensoriais foram realizados e os provadores não perceberam diferenças entre soluções compostas por várias misturas de isomaltulose e sacarose. A maioria dos provadores não diferenciou cafés adoçados com variadas quantidades de isomaltulose em substituição à sacarose, com relação à doçura e ao aroma, e também, não distinguiram suco adoçado com diferentes quantidades dos adoçantes.

Sasaki et al. (1985) comprovaram que o dissacarídeo isomaltulose foi significativamente menos cariogênico e menos propício à multiplicação de *Streptococcus mutans* do que a sacarose. Três grupos de ratos foram submetidos a diferentes dietas, uma com 56,0% de sacarose, outra com 56,0% de isomaltulose e a terceira com uma mistura de 17,5% sacarose e 38,5% isomaltulose. Os ratos foram infectados na cavidade oral com *Streptococcus mutans* E-49. Após oito semanas comprovou-se que o grupo de ratos alimentados

com isomaltulose possuía baixa quantidade de cáries, enquanto que o grupo alimentado com sacarose, possuía altos índices. Os ratos alimentados com a mistura de sacarose e isomaltulose possuíam cáries, mas em menor quantidade do que aqueles alimentados somente com sacarose. Os três grupos não apresentaram diferenças consideráveis no aumento de peso. Os ratos não tiveram diarreia ou qualquer outro distúrbio intestinal. Os autores sugeriram que a isomaltulose poderia ser utilizada como substituto da sacarose no controle da cárie dentária.

Takazoe (1985) relatou que entre os adoçantes utilizados, o dissacarídeo isomaltulose preenche requisitos essenciais como substituto da sacarose. A isomaltulose não favorece o crescimento de *Streptococcus mutans* cariogênico e que a produção de ácido por microrganismos é muito reduzida. Afirmou ainda que a isomaltulose inibe a síntese de poliglucana. Os experimentos com animais e humanos também confirmaram que a isomaltulose tem um nível baixo de cariogenicidade. Efeitos colaterais prejudiciais não foram reconhecidos, ou seja, a isomaltulose é considerada atualmente como um substituto promissor da sacarose. Foi observado que a isomaltulose não era transportada através da mucosa intestinal, mas hidrolisada e absorvida como glicose e frutose.

Kawai et al. (1985) descreveram as variações glicêmicas e a concentração de insulina liberada em resposta a ingestão de isomaltulose e de sacarose. Com a administração de sacarose, a glicemia aumentou muito rapidamente até atingir um pico após 30 minutos, retornando ao nível basal após 90 minutos, enquanto que após a administração de isomaltulose a concentração glicêmica aumentou gradualmente a partir do nível basal e se manteve quase que constante (aproximadamente 110 mg/dL) durante todo o período experimental. Já a concentração plasmática de insulina, após a ingestão de isomaltulose, foi significativamente menor do que aquela após a administração de sacarose. Os autores sugeriram que a diferença se deve à digestibilidade mais lenta da isomaltulose comparada com a da sacarose, de forma que sua absorção também ocorre mais lentamente. Os autores sugeriram que a isomaltulose poderia ser útil como adoçante para diabéticos.

Takazoe et al. (1985a) demonstraram a baixa cariogenicidade da isomaltulose em experimentos *in vitro*. Vários sorotipos de *Streptococcus mutans* não utilizaram isomaltulose e a atividade na produção de ácido foi muito baixa. Nenhuma glucana insolúvel foi sintetizada a partir de isomaltulose por glicosiltransferase de *Streptococcus mutans*. Estudos experimentais com ratos demonstraram baixa cariogenicidade e ação inibidora de poliglucana insolúvel. Estudos com seres humanos testando-se o efeito de freqüentes enxágües orais, com solução de isomaltulose, indicaram que esta é consideravelmente menos acidogênica do que a sacarose. A fermentação da isomaltulose por *Streptococcus mutans* 6715 foi muito baixa em comparação com a da sacarose. O mesmo se comprovou em relação à produção de glucana insolúvel quando se adicionou palatinose (0,25%, 0,5% e 1,0%) em substituição à parte da sacarose. Esta adição provocou a redução da síntese de glucana insolúvel, tendo sido observado que quanto maior a substituição, menor a produção de glucana insolúvel. A partir de solução pura de isomaltulose não foi sintetizada glucana insolúvel. Estudos metabólicos mostraram que a hidrólise de isomaltulose foi menor do que a da sacarose. Como um potencial nutriente parenteral, a isomaltulose foi indicada como clinicamente segura para pacientes diabéticos ou não diabéticos. A isomaltulose foi considerada uma alternativa promissora como substituto da sacarose.

Takazoe (1989) verificou que, com a adição de cerca de 1,5% a 15,0% (p/v) de ácido cítrico, a higroscopicidade da isomaltulose não aumentou como a da sacarose. A adição de ácido cítrico na solução de isomaltulose não provocou a sua inversão, indicando que a isomaltulose adicionada em alimentos acidificados com ácidos orgânicos ou com vitamina C são mais estáveis do que aqueles que contém sacarose. A isomaltulose mostrou-se completamente resistente a ácido. Soluções de isomaltulose e sacarose foram fervidas em meio acidificado (pH 2,0), e suas hidrólises comparadas. Verificou-se que a sacarose foi completamente hidrolisada após 60 minutos, enquanto que a isomaltulose permaneceu intacta. Testes em confeitos indicaram que até 120°C não houve mudanças no sabor, mas

somente pequena alteração na coloração. A 140°C foi observado mudança na coloração, decomposição e polimerização que se intensificaram acima de 160°C.

Lina et al. (1997), com vistas à segurança alimentar, estudaram a teratogenicidade e possíveis alterações que o consumo de isomaltulose poderia causar em fetos de ratos. Foi comprovado que o uso de até 10,0% de isomaltulose na dieta de ratas grávidas, do primeiro até o 21º dia de gestação, não induziu qualquer anormalidade nos fetos. Uma dieta contendo 10,0% de isomaltulose equivale a 7,0 g de isomaltulose/Kg de massa corporal/dia.

2.4.Isomalt® ou Palatinit®

Isomalt® ou Palatinit® é uma mistura equimolar de α -D-glicopiranosídeo-1,6-sorbitol e α -glicopiranosídeo-1,2-manitol e é produzido por hidrogenação da isomaltulose (Goldscher 1997; Degelmann et al., 2000; Duflot et al, 2001).

Em 1985, estimou-se que produção de isomalte seria de aproximadamente 20.000-25.000 toneladas/ano e o preço estimado em US\$ 3/Kg. O consumo de isomalte na Europa correspondia à aproximadamente 15.000 toneladas/ano, nos Estados Unidos a 2.000-3.000 toneladas/ano e na América do Sul a 2.000 toneladas/ano (Sträter, 1985). O autor relatou que o isomalte pode ser obtido na forma cristalina, não é redutor e, ao contrário da sacarose, é extremamente estável à hidrólise enzimática. Também não pode ser fermentado por grande número de leveduras e microrganismos.

O isomalte apresenta cerca da metade da doçura da sacarose e tem sido utilizado como açúcar dietético em produtos de confeitaria, gomas de mascar, bebidas carbonatadas e sobremesas (Snodin, 1983). O isomalte não é higroscópico e o ponto de fusão é de cerca de 145-150°C. O isomalte pode ser facilmente triturado para serem obtidos grânulos de 100 μ m, propriedade que é importante para a fabricação de chocolates e gomas de mascar. O pó finamente granulado pode ser seco para uso como adoçante e pode ser moldado em

tabletes (Sträter, 1985). O isomalte apresenta sabor agradável similar ao algodão doce.

Khan (1994) relatou que isomaltulose e isomalte têm sido utilizados em alimentos como ingredientes, com valor calórico reduzido e não cariogênico. No Japão, isomaltulose é utilizada como adoçante não cariogênico.

Ndindayino et al. (1999) relataram que há um grande interesse em açúcares alternativos, como mono e dissacarídeos álcoois, também chamados polióis, em formulações farmacêuticas. A razão deste interesse é a combinação do sabor natural adocicado, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas. A maioria dos polióis pode ser consumida por diabéticos sem qualquer aumento significativo da glicose, insulina ou concentração de ácido láctico. Dentre os polióis, o isomalte é um açúcar álcool derivado da sacarose. Na primeira etapa de obtenção, a sacarose é convertida em isomaltulose pela transglicosilação enzimática. Este novo açúcar é considerado mais resistente a ácidos e à ação microbiana, pois a ligação 1-6 entre glicose e frutose é mais estável do que a ligação 1-2 da sacarose. No segundo passo do processo, o isomalte é obtido pela hidrogenação da isomaltulose em solução aquosa neutra. Além das vantagens técnicas em comparação a outros polióis, o isomalte tem a vantagem de ser similar à sacarose, muito menos higroscópico e com melhores propriedades organolépticas.

3. Material e Métodos

3.1. Microrganismo

Uma linhagem de bactéria *Erwinia* sp D12, produtora de glicosiltransferase capaz de converter a sacarose em isomaltulose (Celestino, 1998; Moraes, 2002), isolada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, foi utilizada neste estudo.

3.2. Manutenção do microrganismo

A linhagem de *Erwinia* sp D12 foi cultivada em tubos de meio de cultivo inclinado, composto de sacarose 6,0% (p/v), peptona 4,0% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v) e ágar 2,0% (p/v), durante 15 horas, a 30°C. Após incubação, adicionou-se vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas foram mantidas a 5°C, com repicagem a cada 2 meses.

3.3. Estudo da otimização do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12

Estudou-se a substituição parcial ou total dos componentes peptona e extrato de carne do meio de cultivo 1, composto de melaço de cana 12,0% (p/v), peptona Difco 4,0% (p/v) e extrato de carne Biobrás 0,4 % (p/v) descrito por Moraes (2002), por fontes alternativas de nitrogênio, visando à diminuição do custo do processo de fermentação para a produção de glicosiltransferase.

3.3.1. Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Estudou-se o efeito dos componentes peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] em substituição à peptona Difco e extrato de carne do meio de cultivo, proposto por Moraes (2002), na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

O estudo da otimização do meio de cultivo, em frascos sob agitação, foi realizado através da metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta para análise dos efeitos das variáveis independentes (componentes do meio de fermentação) na atividade de glicosiltransferase. Utilizou-se planejamento composto central como combinação entre as variáveis independentes e seus níveis de concentração. Os dados foram analisados com o auxílio do programa computacional STATISTICA[®], versão 5.0 (StatSoft, 1995).

3.3.1.1. Preparação do pré-inóculo

A cultura de 15 horas da linhagem de *Erwinia* sp D 12, em tubos de meio de cultivo inclinado descrito no item 3.2, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Posteriormente, os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas.

3.3.1.2. Fermentação

As fermentações foram realizadas de acordo com os planejamentos experimentais. Transferiram-se alíquotas de 5 mL do pré-inóculo para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, e a produção de glicosiltransferase intracelular determinada após 8 horas de fermentação.

Após a incubação, os meios de cultivo foram centrifugados a 10.000 rpm, a 5°C, por 15 minutos. Para a extração da glicosiltransferase intracelular, a massa celular foi lavada 2 vezes com água destilada, ressuspensa em 50 mL de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0. A suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a tratamento em ultrasonicador por 20 segundos, a 180-200 W. Após a lise da parede celular as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos, e a atividade da glicosiltransferase determinada no sobrenadante como descrito no item 3.3.1.3.

3.3.1.3.Determinação da atividade de glicosiltransferase

Determinou-se a atividade da enzima glicosiltransferase pelo aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose como descrito por Uekane (1993). A mistura de 450 µL da solução de sacarose 4,0% (p/v) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0 e 50 µL de solução enzimática foi incubada a 35°C, por 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1944), utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro utilizou-se um branco substituindo-se 50 µL de amostra por 50 µL de água destilada na mistura de reação. Uma unidade de atividade (UA) de glicosiltransferase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de isomaltulose/minuto/mL da enzima a partir de sacarose.

3.3.2.Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melaço de cana, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Estudou-se o efeito dos componentes água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD® em substituição à peptona Difco e extrato de carne do meio de cultivo, proposto por Moraes (2002), na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12. O estudo da otimização do meio de cultivo foi realizado como descrito no item 3.3.1.

3.4. Estudo da relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo 2 e produção de glicosiltransferase pela linhagem de *Erwinia* sp D 12, em fermentador de 5 litros a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C

A cinética de crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12, em meio de cultivo 2 otimizado, foi estudada em fermentador de 5 litros New Brunswick Bioflow II a 24°C, 26°C, 28°C e a 30°C.

3.4.1. Preparação do pré-inóculo

A cultura de 15 horas da linhagem *Erwinia* sp D12, em meio de cultivo inclinado descrito no item 3.2, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L), como descrito no item 3.3.1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas.

3.4.2. Fermentação em fermentador de 5 litros

Uma alíquota de 300 mL de pré-inóculo, preparado como descrito no item anterior, e 1 mL de antiespumante foram adicionados assepticamente em fermentador de 5 litros contendo 2.700 mL de meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L), e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L), como descrito no item 3.3.1. A fermentação foi realizada a 24°C, 26°C, 28°C e a 30°C, na qual a agitação e aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 1 vvm. Coletaram-se alíquotas de 20 mL de meio de cultivo em diferentes tempos de fermentação. A massa celular foi separada por centrifugação a 10.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos. Foram determinados a alteração do pH do meio de cultivo e o crescimento do

microrganismo como descrito no item 3.4.3. A atividade de glicosiltransferase foi determinada como descrito no item 3.3.1.3.

3.4.3.Crescimento do microrganismo

O crescimento celular foi estimado através da medida da absorbância, a 660 nm, em espectrofotômetro Beckmann DU 70. Alíquotas de 20 mL do meio de cultivo, após fermentação, foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as massas celulares foram lavadas duas vezes com 20 mL de água destilada e ressuspensas em 20 mL de água destilada. Quando necessário, as suspensões foram diluídas para obtenção de absorbância na faixa de 0,1 a 0,9. Água destilada foi utilizada como branco.

3.5.Produção de massa celular de *Erwinia* sp D12 em fermentador

A obtenção de células de *Erwinia* sp D12 contendo glicosiltransferase intracelular foi realizada através de fermentação do microrganismo em fermentador New-Brunswick Bioflow II de 5 litros.

3.5.1.Preparação do pré-inóculo

A cultura de 15 horas da linhagem de *Erwinia* sp D 12, em meio de cultivo inclinado descrito no item 3.2, foi inoculada em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), como descrito no item 3.3.1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 15 horas.

3.5.2.Fermentação

Uma alíquota de 300 mL de pré-inóculo e 1 mL de antiespumante foram adicionados assepticamente em fermentador de 5 litros contendo 2.700 mL de meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), como descrito no item 3.3.1. A fermentação foi realizada a 24°C, por 10 horas, na qual a agitação e aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 1 vvm. A massa celular foi separada por centrifugação, lavada duas vezes com água destilada a 10.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos e utilizada como descrito a seguir.

3.6.Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de *Erwinia* sp D 12, em processo em batelada

3.6.1.Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre

Para a extração da enzima intracelular, uma amostra de suspensão de 2 g de massa celular úmida de *Erwinia* sp D12 lavada obtida como descrito no item 3.5, foi ressuspensa em 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v) e submetida à ultrasonicação, a 180-200 W, durante 20-30 segundos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, a 5°C, durante 10 minutos e o sobrenadante foi incubado em frasco Erlenmeyer de 250 mL sob agitação a 150 rpm, a 30°C, durante 12 horas. Para a preparação de solução de sacarose 35,0% (p/v), uma amostra de 221,52 g de açúcar cristal foi adicionada em frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de água destilada, logo após a esterilização por autoclavagem. A solução de sacarose foi resfriada à temperatura ambiente.

As análises de carboidratos foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Waters 600E, utilizando-se coluna Zorbax-NH₂ (250 mm x

4,6 mm) e fase móvel acetonitrila : água ultra-purificada 75:25 (v:v), com fluxo de 1 mL/min, a 35°C. Os carboidratos foram identificados através do tempo de retenção, por comparação com padrões de frutose, glicose, sacarose e isomaltulose.

3.6.2. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12

Uma amostra de 2 g de massa celular úmida de *Erwinia* sp D12, obtida como descrito no item 3.5, foi ressuspensa em 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v) em tampão fosfato, 0,05 M, pH 6,0. A amostra de suspensão celular foi incubada em frasco Erlenmeyer de 250 mL sob agitação a 150 rpm, a 30°C, durante 12 horas de reação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos e a conversão da sacarose em isomaltulose determinada no sobrenadante. Em seguida, adicionou-se nova amostra de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v) no frasco contendo a massa celular e a suspensão foi incubada em frasco Erlenmeyer de 250 mL sob agitação a 150 rpm, a 30°C, durante 12 horas. O sobrenadante foi separado por centrifugação, como descrito na primeira etapa, e a conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada como citado no item 3.6.1.

3.6.3. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio

Uma amostra de 2 g de massa celular úmida de *Erwinia* sp D12, obtida como descrito no item 3.5, ressuspensa em 10 mL de água destilada esterilizada foi misturada com 20 mL de solução 1,0% (p/v) de alginato de sódio de alta viscosidade Sigma A-7128, de *Macrocystis pyrifera*, em água destilada, contendo 0,1% de Tween 80. Para a preparação de solução 1,0% de alginato de sódio Sigma em água destilada, a solução foi previamente esterilizada e em seguida

adicionou-se Tween 80. A amostra de suspensão celular em alginato foi gotejada em solução 2,0% de CaCl_2 (p/v) utilizando-se bomba peristáltica MasterFlex L/S multicanal. Os grânulos de células imobilizadas foram mantidos na solução 2,0% de CaCl_2 , a 5-10°C, por 24 horas. Posteriormente, os grânulos de células imobilizadas foram filtrados e lavados com água destilada estéril e transferidos para frasco Erlenmeyer de 250 mL sob agitação contendo 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v). O frasco foi incubado a 150 rpm, a 30°C, durante 12 horas. A solução de açúcar foi separada por filtração, com gaze, e em seguida adicionou-se nova amostra de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v). A amostra foi incubada durante 12 horas, como descrito acima e a conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada no filtrado, como citado no item 3.6.1.

3.7. Estudo da imobilização de células de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio

Estudou-se a imobilização das células de *Erwinia* sp D12 em diferentes alginatos de sódio e o efeito da concentração de células imobilizadas na conversão de sacarose em isomaltulose.

3.7.1. Imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em diferentes alginatos de sódio, e conversão de sacarose em isomaltulose em processo em batelada

Para o estudo da imobilização em diferentes alginatos de sódio, as células de *Erwinia* sp D12 foram preparadas como descrito no item 3.5.

Alíquotas de 60 mL de suspensão celular 20% de *Erwinia* sp D12, em água destilada previamente esterilizada (20 g massa celular úmida/100 mL), foram misturadas com 120 mL de soluções 1,0%, 1,5% e 2,0% de alginato de sódio Sigma, Synth e Vetec com 0,1% de Tween 80, previamente esterilizadas. As amostras de suspensão celular em alginato foram gotejadas em solução 2,0% de CaCl_2 (p/v), previamente esterilizada. Os grânulos de células imobilizadas foram

mantidos na solução 2,0% de CaCl_2 (p/v), a 5-10°C, por 24 horas. Posteriormente, os grânulos de células imobilizadas foram filtrados e lavados com água destilada estéril.

Amostras de 20 g de grânulos de células imobilizadas foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v), preparada como descrito no item 3.6.1. Os frascos foram incubados em banho-maria a 30°C, com agitação a 150 rpm, e as amostras de solução de açúcares foram coletadas após 24, 36 e 48 horas de incubação. Após cada coleta, as alíquotas de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v) foram substituídas por nova amostra de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v).

3.7.2. Imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em alginatos de sódio Synth e Sigma em diferentes concentrações, e conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

A conversão de sacarose em isomaltulose foi testada em bioreator, utilizando-se células imobilizadas com solução 1,5% (p/v) de alginato de sódio Synth, 1,5% (p/v) de alginato de sódio Sigma e 2,0% (p/v) de alginato de sódio Synth.

Suspensões contendo 20% (p/v) de células úmidas de *Erwinia* sp D12, obtidas de acordo com o item 3.5, em água destilada esterilizada, foram misturadas com soluções esterilizadas de 1,5% de alginatos de sódio Synth e Sigma (p/v) e 2,0% de alginato de sódio Synth (p/v), contendo 0,1% de Tween 80, na proporção 1:2. A suspensão celular foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica em solução de CaCl_2 2,0% (p/v), previamente esterilizada, para a formação de grânulos de aproximadamente 3 mm de diâmetro. Os grânulos contendo células imobilizadas foram mantidos imersos em solução CaCl_2 2,0% (p/v), a 5°C-10°C, por 24 horas.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose, as amostras de 100 g de grânulos contendo células imobilizadas foram transferidas para três bioreatores encamisados (150 mm x 30 mm). Uma solução de sacarose 35,0%

(p/v), preparada como descrito no item 3.6.1, foi circulada no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 2 mL/min, e a conversão acompanhada por 72 horas. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C. A conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada como descrito no item 3.6.1.

A Figura 2 ilustra o experimento de conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas com soluções de alginato de sódio Sigma 1,5%, alginato Synth 1,5% e alginato de sódio Synth 2,0%.

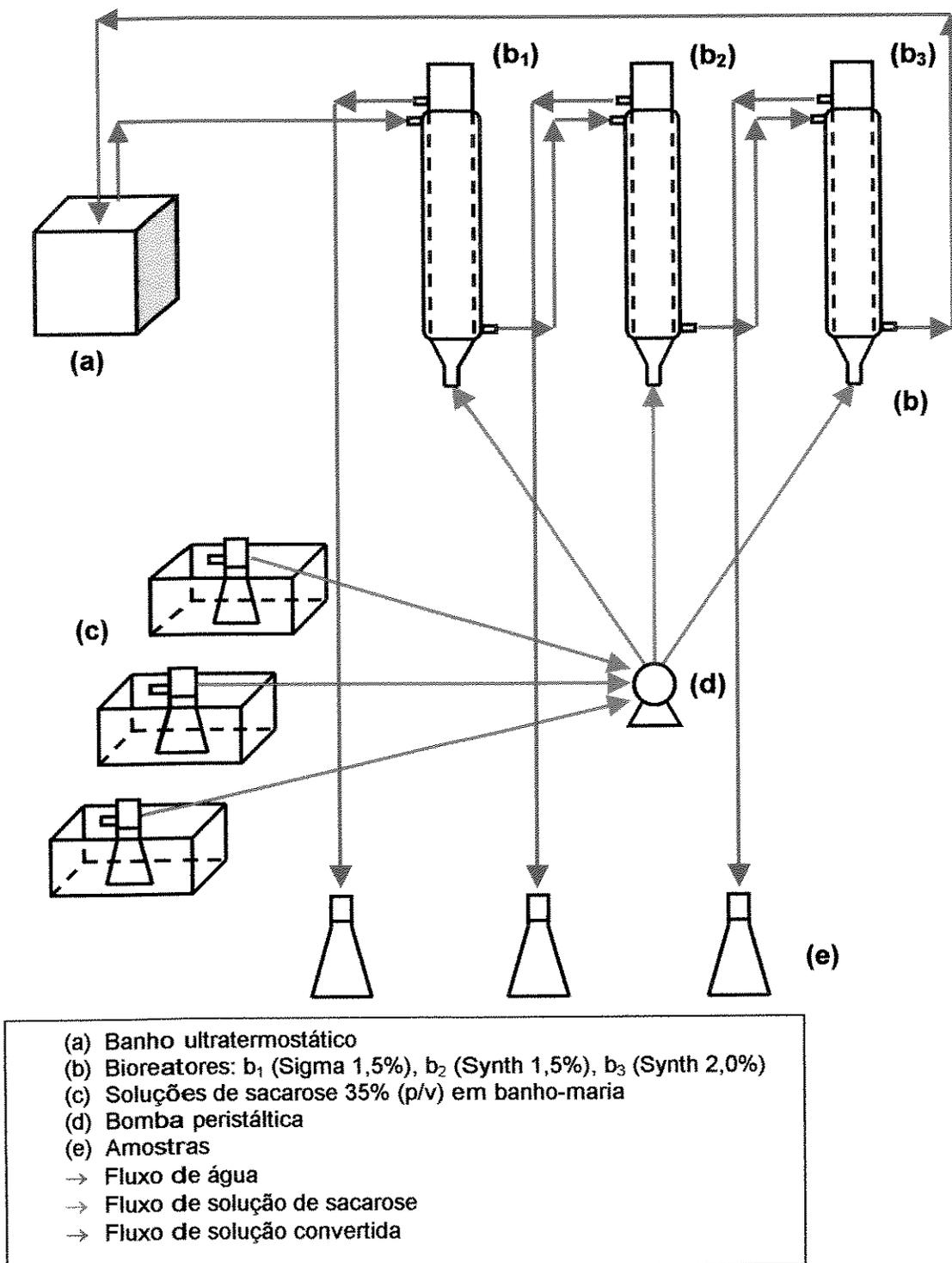


Figura 2: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas com soluções de alginato de sódio Sigma 1,5%, alginato de sódio Synth 1,5% e alginato Synth 2,0%.

3.7.3. Efeito da concentração de células de *Erwinia* sp D12 immobilizadas em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator

Suspensões contendo 20,0%, 30,0% e 40,0% (p/v) de células úmidas de *Erwinia* sp D12, obtidas de acordo com o item 3.5, em água destilada esterilizada, foram misturadas com solução esterilizada 2,0% de alginato de sódio Synth, em água destilada, contendo 0,1% de Tween 80, na proporção 1:2. A solução 2,0% de alginato de sódio foi previamente esterilizada como descrito anteriormente. A suspensão celular foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica em solução de CaCl_2 2,0% (p/v), previamente esterilizada, para a formação de grânulos de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro. Os grânulos contendo células immobilizadas foram mantidos imersos em solução de CaCl_2 2,0% (p/v), a 5°C-10°C, por 24 horas.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose, as amostras de 100 g de grânulos contendo células immobilizadas foram transferidas para bioreatores encamisados (150 mm x 30 mm). Amostras de solução de sacarose 35% (p/v) foram circuladas no sentido ascendente, com fluxo de 2 mL/min. A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e a conversão de sacarose em isomaltulose foi acompanhada durante 96 horas. A conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada como descrito no item 3.6.1.

A Figura 3 ilustra o experimento de conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se diferentes concentrações de células de *Erwinia* sp D12 nos grânulos de células immobilizadas em alginato de cálcio.

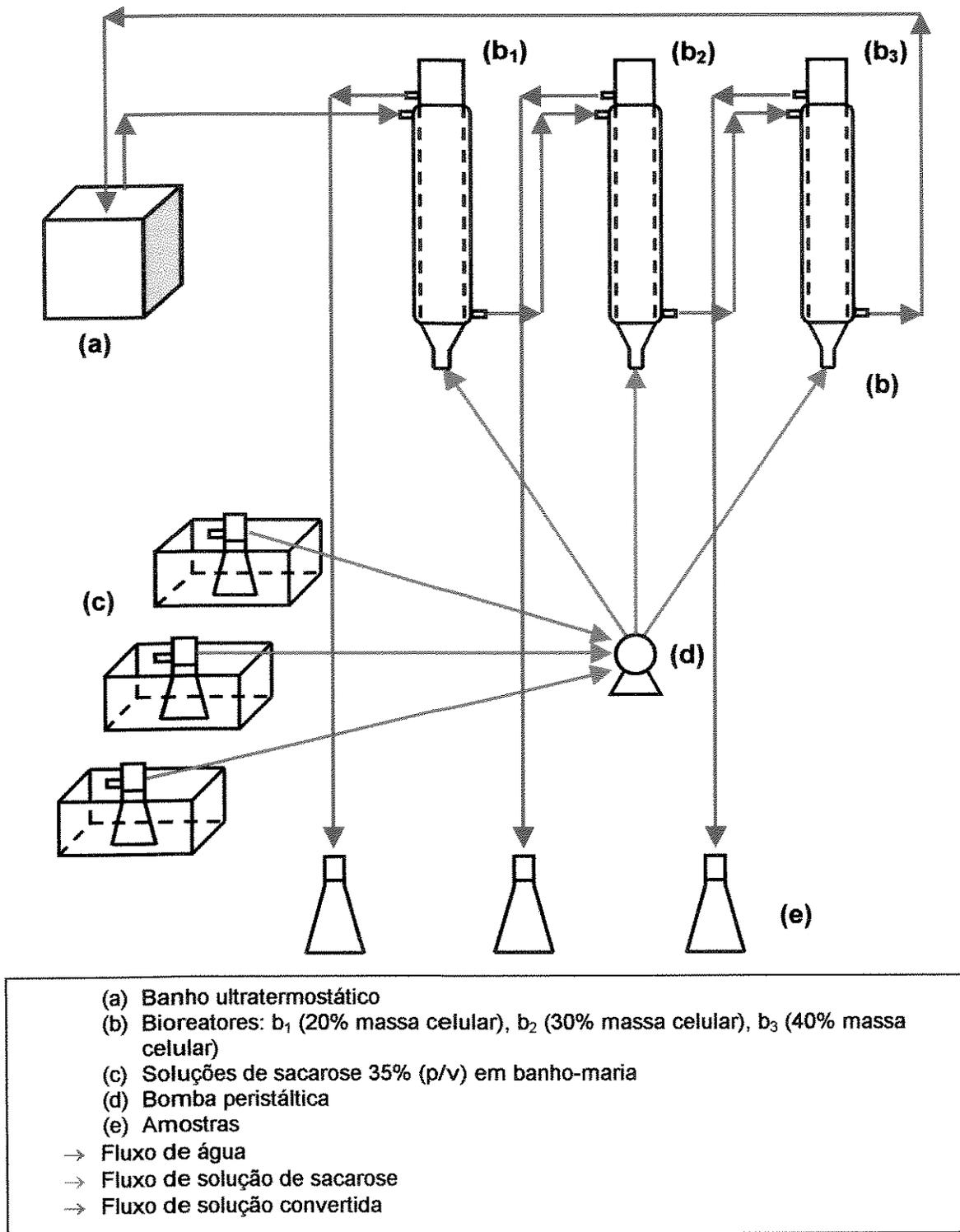


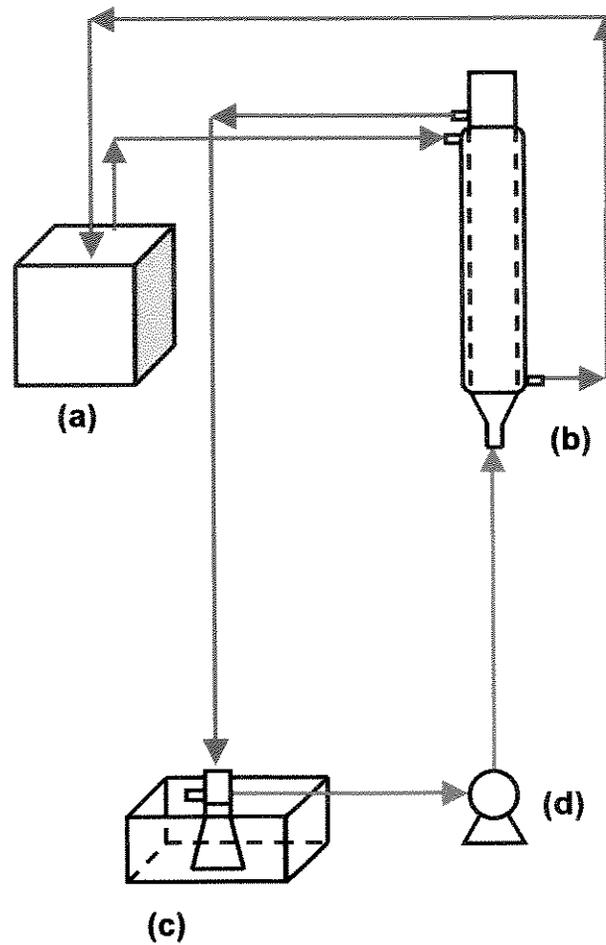
Figura 3: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, utilizando-se diferentes concentrações de células de *Erwinia* sp D12 nos grânulos de células imobilizadas em alginato de cálcio.

3.7.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, em bioreator, com recirculação do substrato

Uma suspensão de 100 mL de células úmidas de *Erwinia* sp D12 na concentração de 40,0% (p/v), obtidas de acordo com o item 3.5, em água destilada esterilizada, foi misturada com 200 mL de solução 2,0% de alginato de sódio Synth (p/v) contendo 0,1% de Tween 80, previamente esterilizada, na proporção 1:2. A suspensão celular foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica em solução de CaCl_2 2,0% (p/v), previamente esterilizada, para a formação de grânulos de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro. Os grânulos contendo células imobilizadas foram mantidos imersos em solução de CaCl_2 2% (p/v), a 5°C-10°C, por 24 horas.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose, uma amostra de 100 g de grânulos contendo células imobilizadas foi transferida para bioreator encamisado (150 mm x 30 mm). Uma alíquota de 165 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v), preparada como descrito anteriormente, foi circulada em circuito fechado, no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 4 mL/min, e a conversão acompanhada por 24 horas. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C. A conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada como descrito no item 3.6.1.

A Figura 4 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, e circulação do substrato sacarose 35,0% (p/v) em circuito fechado.



- (a) Banho ultratermostático
(b) Bioreator
(c) Solução de sacarose 35% (p/v) em banho-maria
(d) Bomba peristáltica
→ Fluxo de água
→ Fluxo de solução de sacarose
→ Fluxo de solução convertida

Figura 4: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, e circulação do substrato sacarose 35,0% em circuito fechado.

4.Resultados e Discussão

4.1.Estudo da otimização do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12

4.1.1.Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (ELP) para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Para o estudo da substituição dos componentes peptona Difco e extrato de carne do meio de cultivo, proposto por Moraes (2002), para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, foram realizados quatro planejamentos composto central visando à otimização do meio de cultivo como descrito no item 3.3.1.

As Tabelas 3 a 21 e as Figuras 5 a 9 ilustram os resultados dos planejamentos experimentais visando à substituição dos componentes peptona Difco (40,0 g/L) e extrato de carne (4,0 g/L) do meio de cultivo, proposto por Moraes (2002), por componentes alternativos, para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12.

4.1.2.Primeiro planejamento

O primeiro planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 3 e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 4.

Analisando-se os valores de atividade obtidos, na Tabela 3, verifica-se um incremento nos valores de atividade enzimática, variando-se de 5,34 UA/mL para o ensaio 6 (159,76 g/L de melaço, 4,05 g/L de peptona e 35,95 g/L de ELP) até

uma atividade máxima de 10,55 UA/mL, para o ensaio 8 (159,76 g/L de melão, 15,95 g/L de peptona e 35,95 g/L de ELP).

Tabela 3: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	5,90
2	+1	-1	-1	9,46
3	-1	+1	-1	6,56
4	+1	+1	-1	9,17
5	-1	-1	+1	6,81
6	+1	-1	+1	5,34
7	-1	+1	+1	6,63
8	+1	+1	+1	10,55
9	-1,68	0	0	5,63
10	+1,68	0	0	8,41
11	0	-1,68	0	7,61
12	0	+1,68	0	8,41
13	0	0	-1,68	8,97
14	0	0	+1,68	8,74
15	0	0	0	8,38
16	0	0	0	8,67
17	0	0	0	7,63

Tabela 4: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana (g/L)	80,00	100,24	130,00	159,76	180,00
Peptona (g/L)	0,00	4,05	10,00	15,95	20,00
ELP (g/L)	20,00	24,05	30,00	35,95	40,00

A Tabela 5 apresenta o efeito das variáveis sobre a atividade da glicosiltransferase. O melão e a peptona apresentaram efeitos positivos significativos na atividade enzimática. No entanto, o ELP não afetou individualmente a produção de glicosiltransferase, mas a sua interação com a peptona gerou efeito positivo significativo. Estes resultados indicam que o aumento do melão, peptona e ELP na composição do meio de cultivo provocariam um aumento da atividade. Assim, no planejamento seguinte foram utilizados níveis maiores de concentração dos três componentes de meio do cultivo.

Tabela 5: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melão de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

	Efeito UA/mL	Desvio Padrão	t(2)	p	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	8,25	0,31	26,73	0,001	7,35	9,16
(1) Melão (L)*	1,95	0,29	6,71	0,021	1,10	2,80
Melão (Q)*	-1,03	0,32	-3,22	0,085	-1,96	-0,10
(2) Peptona (L)*	0,99	0,29	3,41	0,076	0,14	1,84
Peptona (Q)	-0,33	0,32	-1,03	0,413	-1,26	0,61
(3) ELP (L)	-0,31	0,29	-1,08	0,392	-1,16	0,53
ELP (Q)	0,27	0,32	0,84	0,490	-0,67	1,20
1L x 2L*	1,11	0,38	2,93	0,100	0,00	2,22
1L x 3L	-0,93	0,38	-2,46	0,133	-2,04	0,17
2L by 3L*	1,17	0,38	3,08	0,091	0,06	2,27

* parâmetros estatisticamente significativos (90% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

A Tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase e a Tabela 7, a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,72 e o teste F (3,06 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 90% de nível de confiança, permitindo a obtenção de um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 6: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -90%	Limite de Confiança +90%
Média*	8,25	0,31	7,35	9,16
(1) Melaço (L)*	0,97	0,15	0,55	1,40
Melaço (Q)*	-0,51	0,16	-0,98	-0,05
(2) Peptona (L)*	0,49	0,15	0,07	0,92
Peptona (Q)	-0,16	0,16	-0,63	0,30
(3) ELP (L)	-0,16	0,15	-0,58	0,27
ELP (Q)	0,13	0,16	-0,33	0,60
1L x 2L*	0,55	0,19	0,00	1,11
1L x 3L	-0,47	0,19	-1,02	0,09
2L by 3L*	0,58	0,19	0,03	1,14

* parâmetros estatisticamente significativos (90% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 7: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	24,80	04	6,20	7,59
Resíduos	9,80	12	0,82	
Falta de Ajuste	9,22	10	0,92	
Erro Puro	0,57	02	0,29	
Total	34,59	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,72$

$F_{0,90;4;12} = 2,48$

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 1).

$$\text{Atividade} = 8,25 + 0,97.\text{Melaço} - 0,51.\text{Melaço}^2 + 0,49.\text{Peptona} + 0,55.\text{Melaço}.\text{Peptona} + 0,58\text{Peptona}.\text{ELP} \quad (1)$$

As Figuras 5(a), 5(b) e 5(c) ilustram os efeitos dos componentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD® na atividade de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Através da análise da Figura 5(a) verifica-se que a atividade enzimática é maior em maiores concentrações de melaço e de peptona. Na Figura 5(b), pode-se observar que a atividade é maior em maiores concentrações de melaço. Pela Figura 5(c), verifica-se que a atividade enzimática tende a aumentar com o

aumento das concentrações de peptona e de ELP. Desse modo, as superfícies de resposta e curvas de contorno indicam que as concentrações de melação, peptona e ELP devem ser aumentadas, no meio de cultivo, para que produção de glicosiltransferase seja otimizada.

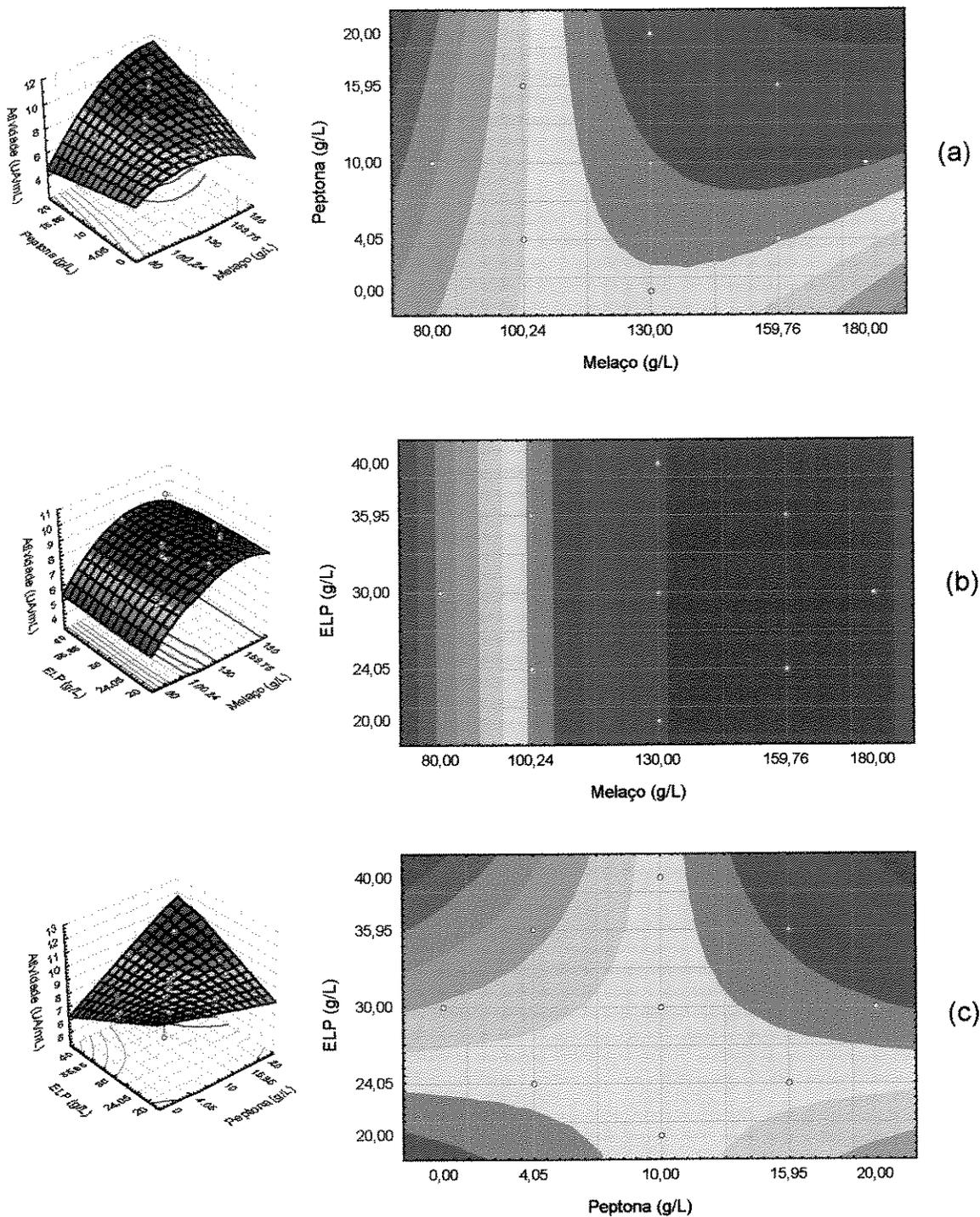


Figura 5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melço de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao primeiro planejamento.

4.1.3. Segundo planejamento

O segundo planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes melação de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 8 e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 9.

Analisando-se os valores de atividade obtidos, na tabela 8, verifica-se que houve um decréscimo nos valores de atividade enzimática com relação ao planejamento anterior. A atividade de glicosiltransferase variou de 0,13 UA/mL para o ensaio 2 (219,64 g/L de melação, 18,10 g/L de peptona e 37,14 g/L de ELP) a uma atividade máxima de 5,97 UA/mL, para o ensaio 3 (130,36 g/L de melação, 41,90 g/L de peptona e 37,14 g/L de ELP). Como indicado no planejamento anterior, as faixas de concentração de todos os componentes de meio de cultivo foram aumentadas.

Tabela 8: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	5,63
2	+1	-1	-1	0,13
3	-1	+1	-1	5,97
4	+1	+1	-1	0,20
5	-1	-1	+1	0,63
6	+1	-1	+1	0,28
7	-1	+1	+1	0,32
8	+1	+1	+1	2,12
9	-1,68	0	0	2,26
10	+1,68	0	0	0,38
11	0	-1,68	0	0,41
12	0	+1,68	0	1,19
13	0	0	-1,68	0,85
14	0	0	+1,68	0,40
15	0	0	0	0,42
16	0	0	0	0,47
17	0	0	0	0,48

Tabela 9: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana(g/L)	100,00	130,36	175,00	219,64	250,00
Peptona (g/L)	10,00	18,10	30,00	41,90	50,00
ELP (g/L)	25,00	37,14	55,00	72,86	85,00

A Tabela 10 apresenta o efeito das variáveis sobre a atividade da glicosiltransferase. Com relação aos efeitos significativos de cada componente, a peptona apresentou efeito positivo enquanto que o melão e o ELP, efeitos negativos. Estes resultados indicam que o aumento da concentração de peptona, na composição do meio de cultivo, resultaria em incremento da atividade, enquanto que o aumento das concentrações do melão e do ELP acarretaria uma diminuição da atividade de glicosiltransferase. Assim, foi realizado um novo planejamento utilizando-se níveis menores de concentrações de melão e ELP.

Tabela 10: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melão de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

	Efeito UA/mL	Desvio Padrão	t(2)	p	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	0,39	0,02	22,96	0,002	0,32	0,47
(1) Melão (L)*	-1,90	0,02	-118,74	0,000	-1,97	-1,83
Melão (Q)*	1,04	0,02	59,08	0,000	0,97	1,12
(2) Peptona (L)*	0,48	0,02	29,69	0,001	0,41	0,54
Peptona (Q)*	0,68	0,02	38,31	0,001	0,60	0,75
(3) ELP (L)*	-1,37	0,02	-85,28	0,000	-1,44	-1,30
ELP (Q)*	0,55	0,02	31,06	0,001	0,47	0,62
1L x 2L*	0,47	0,02	22,61	0,002	0,38	0,56
1L x 3L*	3,18	0,02	151,86	0,000	3,09	3,27
2L by 3L*	0,28	0,02	13,44	0,005	0,19	0,37

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase e a Tabela 12, a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,84 e o teste F (2,05 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 95% de nível de confiança, permitindo a obtenção de um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 11: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	0,39	0,02	0,32	0,47
(1) Melaço (L)*	-0,95	0,01	-0,99	-0,92
Melaço (Q)*	0,52	0,01	0,48	0,56
(2) Peptona (L)*	0,24	0,01	0,20	0,27
Peptona (Q)*	0,34	0,01	0,30	0,38
(3) ELP (L)*	-0,68	0,01	-0,72	-0,65
ELP (Q)*	0,27	0,01	0,24	0,31
1L x 2L*	0,24	0,01	0,19	0,28
1L x 3L*	1,59	0,01	1,54	1,63
2L by 3L*	0,14	0,01	0,10	0,19

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 12: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	45,53	08	5,69	7,06
Resíduos	6,45	08	0,81	
Falta de Ajuste	6,44	06	1,07	
Erro Puro	0,00	02	0,00	
Total	51,97	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,84$

$F_{0,95;8;8} = 3,44$

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 2).

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 0,39 - 0,95.\text{Melaço} + 0,52.\text{Melaço}^2 + 0,24.\text{Peptona} + \\ & 0,34.\text{Peptona}^2 - 0,68.\text{ELP} + 0,27.\text{ELP}^2 + 0,24.\text{Melaço}.\text{Peptona} + \\ & 1,59.\text{Melaço}.\text{ELP} + 0,14.\text{AMM}.\text{ELP} \end{aligned} \quad (2)$$

As Figuras 6(a), 6(b) e 6(c) ilustram os efeitos dos componentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD® na atividade de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Através da análise da Figura 6(a) verifica-se que a atividade enzimática é maior em menores concentrações de melaço. Na Figura 6(b), pode-se observar que a atividade é maior em menores concentrações de melaço e de ELP. Pela

Figura 6(c), verifica-se que a atividade enzimática tende a aumentar com a diminuição da concentração de peptona. Desse modo, as superfícies de resposta e curvas de contorno indicam que as concentrações de melaço, peptona e ELP devem ser diminuídas para que o meio de cultivo, para a produção de glicosiltransferase, seja otimizado.

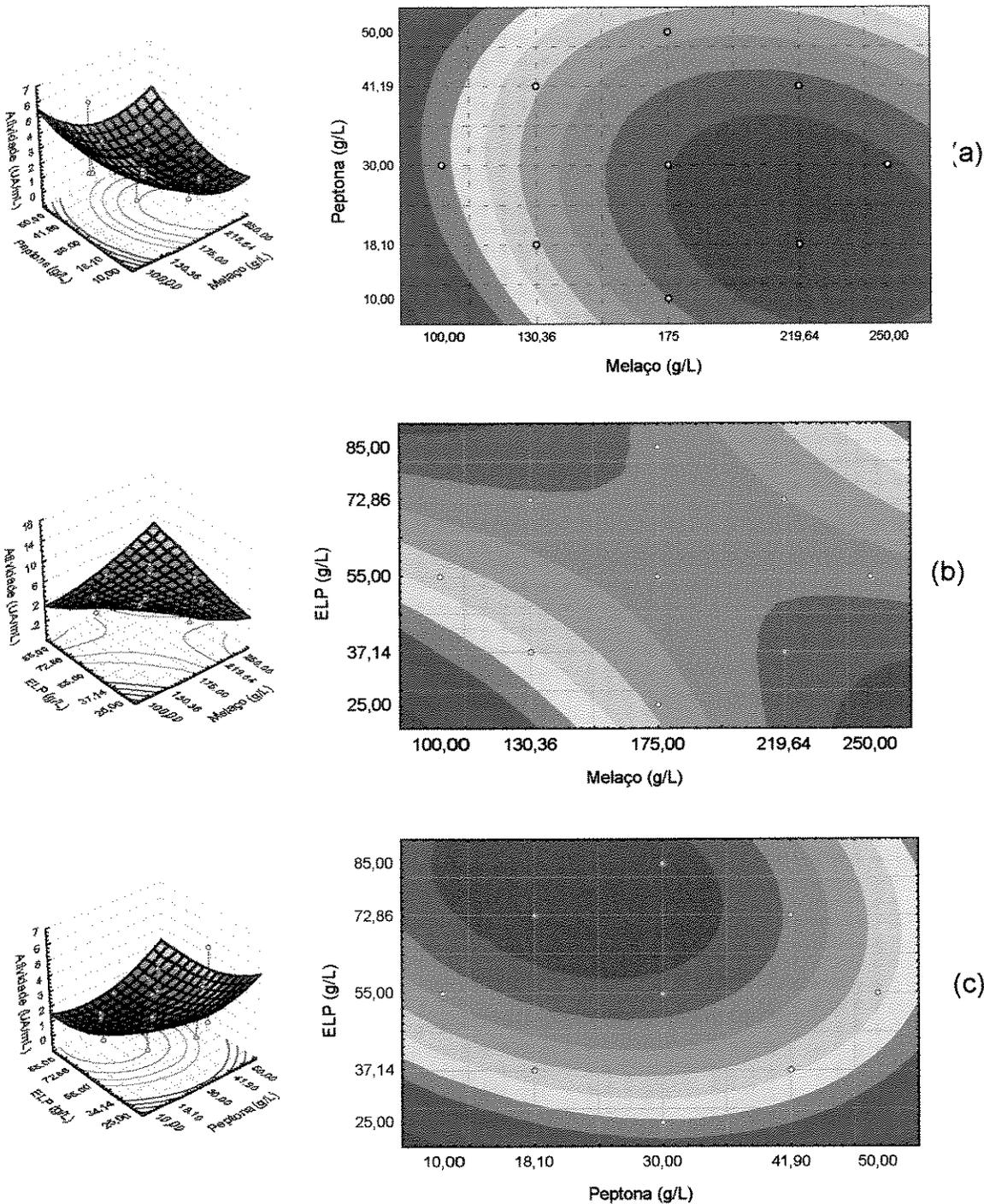


Figura 6: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melão de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melão de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao segundo planejamento.

4.1.4. Terceiro planejamento

O terceiro planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes melão de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 13 e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 14.

Analisando-se os valores de atividade obtidos, na Tabela 13, verifica-se que houve um incremento nos valores de atividade enzimática com relação ao planejamento anterior. A atividade de glicosiltransferase variou de 4,99 UA/mL para o ensaio 9 (100,00 g/L de melão, 20,00 g/L de peptona e 30,00 g/L de ELP) a uma atividade máxima de 8,97 UA/mL, para o ensaio 4 (179,76 g/L de melão, 28,93 g/L de peptona e 18,10 g/L de ELP). Como indicado no planejamento anterior, as faixas de todos os componentes de meio de cultivo foram diminuídas.

Tabela 13: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	6,34
2	+1	-1	-1	8,28
3	-1	+1	-1	7,56
4	+1	+1	-1	8,97
5	-1	-1	+1	7,39
6	+1	-1	+1	8,68
7	-1	+1	+1	6,63
8	+1	+1	+1	6,28
9	-1,68	0	0	4,99
10	+1,68	0	0	7,01
11	0	-1,68	0	7,06
12	0	+1,68	0	7,47
13	0	0	-1,68	8,47
14	0	0	+1,68	7,06
15	0	0	0	8,43
16	0	0	0	8,23
17	0	0	0	7,83

Tabela 14: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana (g/L)	100,00	120,24	150,00	179,76	200,00
Peptona (g/L)	5,00	11,07	20,00	28,93	35,00
ELP (g/L)	10,00	18,10	30,00	41,90	50,00

A Tabela 15 apresenta o efeito das variáveis sobre a atividade da glicosiltransferase. O ELP apresentou efeito negativo significativo na atividade enzimática, ou seja, um incremento dos valores deste componente acarretaria numa diminuição da atividade de glicosiltransferase. A peptona, isoladamente, não apresentou efeito significativo, mas sua interação com os componentes, melão e extrato ELP apresentou efeito negativo significativo na atividade de glicosiltransferase. Este resultado indica que se houvesse um aumento dos níveis de concentração do componente peptona, no meio de cultivo, haveria um decréscimo da atividade enzimática. O melão apresentou efeito positivo significativo, ou seja, um aumento da concentração deste componente resultaria num incremento da atividade de glicosiltransferase.

Estes resultados indicam que o aumento das concentrações de peptona e ELP, na composição do meio de cultivo, provocaria uma queda da atividade de glicosiltransferase, enquanto que o aumento da concentração do melão incrementaria a atividade enzimática. Assim, no próximo planejamento foram utilizados níveis menores de concentração de ELP e níveis maiores de melão.

Tabela 15: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.

	Efeito UA/mL	Desvio Padrão	t(2)	p	Limite de Confiança -80%	Limite de Confiança +80%
Média*	8,13	0,29	28,19	0,000	7,72	8,53
(1) Melaço (L)*	1,13	0,27	4,16	0,004	0,74	1,51
Melaço (Q)*	-1,28	0,30	-4,28	0,004	-1,70	-0,85
(2) Peptona (L)	-0,08	0,27	-0,30	0,775	-0,46	0,30
Peptona (Q)*	-0,38	0,30	-1,27	0,245	-0,80	0,04
(3) ELP (L)*	-0,66	0,27	-2,45	0,044	-1,05	-0,28
ELP (Q)	-0,02	0,30	-0,08	0,938	-0,45	0,40
1L x 2L*	-0,54	0,35	-1,53	0,170	-1,04	-0,04
1L x 3L*	-0,60	0,35	-1,70	0,132	-1,10	-0,10
2L by 3L*	-1,27	0,35	-3,59	0,009	-1,77	-0,77

* parâmetros estatisticamente significativos (80% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

A Tabela 16 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase e a Tabela 17, a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,90 e o teste F (4,38 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 80% de nível de confiança, permitindo a obtenção de um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 16: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança	Limite de Confiança
			-80%	+80%
Média*	8,13	0,29	7,72	8,53
(1) Melaço (L)*	0,56	0,14	0,37	0,76
Melaço (Q)*	-0,64	0,15	-0,85	-0,43
(2) Peptona (L)	-0,04	0,14	-0,23	0,15
Peptona (Q)*	-0,19	0,15	-0,40	0,02
(3) ELP (L)*	-0,33	0,14	-0,52	-0,14
ELP (Q)	-0,01	0,15	-0,22	0,20
1L x 2L*	-0,27	0,18	-0,52	-0,02
1L x 3L*	-0,30	0,18	-0,55	-0,05
2L by 3L*	-0,63	0,18	-0,88	-0,38

* parâmetros estatisticamente significativos (80% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 17: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	15,75	06	2,63	19,13
Resíduos	1,37	10	0,14	
Falta de Ajuste	1,56	08	0,19	
Erro Puro	0,19	02	0,09	
Total	17,12	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,90$

$F_{0,80;6;10} = 4,37$

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 3).

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 8,13 + 0,56.\text{Melaço} - 0,64.\text{Melaço}^2 - 0,19.\text{Peptona}^2 - \\ & 0,33.\text{ELP} - 0,27.\text{Melaço}.\text{ELP} - 0,30.\text{Melaço}.\text{ELP} - \\ & 0,63.\text{Peptona}.\text{ELP} \end{aligned} \quad (3)$$

As Figuras 7(a), 7(b) e 7(c) ilustram os efeitos dos componentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD® na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Através da análise da Figura 7(a) pode-se observar que a atividade de glicosiltransferase é maior em concentrações de peptona na faixa de 5 g/L a 35 g/L e em concentrações de melaço entre 150 g/L e 200 g/L. Na Figura 7(b),

verifica-se que a atividade de glicosiltransferase é maior em menores concentrações de ELP. Pela Figura 7(c), verifica-se que a atividade de glicosiltransferase tende a aumentar com a diminuição da concentração de ELP e em maiores concentrações de peptona. Desse modo, as superfícies de resposta e curvas de contorno indicam que as concentrações de melão devem ser aumentadas, enquanto que as de ELP devem ser diminuídas. Já a concentração de peptona deve ser mantida na faixa estudada neste terceiro planejamento para que seja obtida maior atividade de glicosiltransferase.

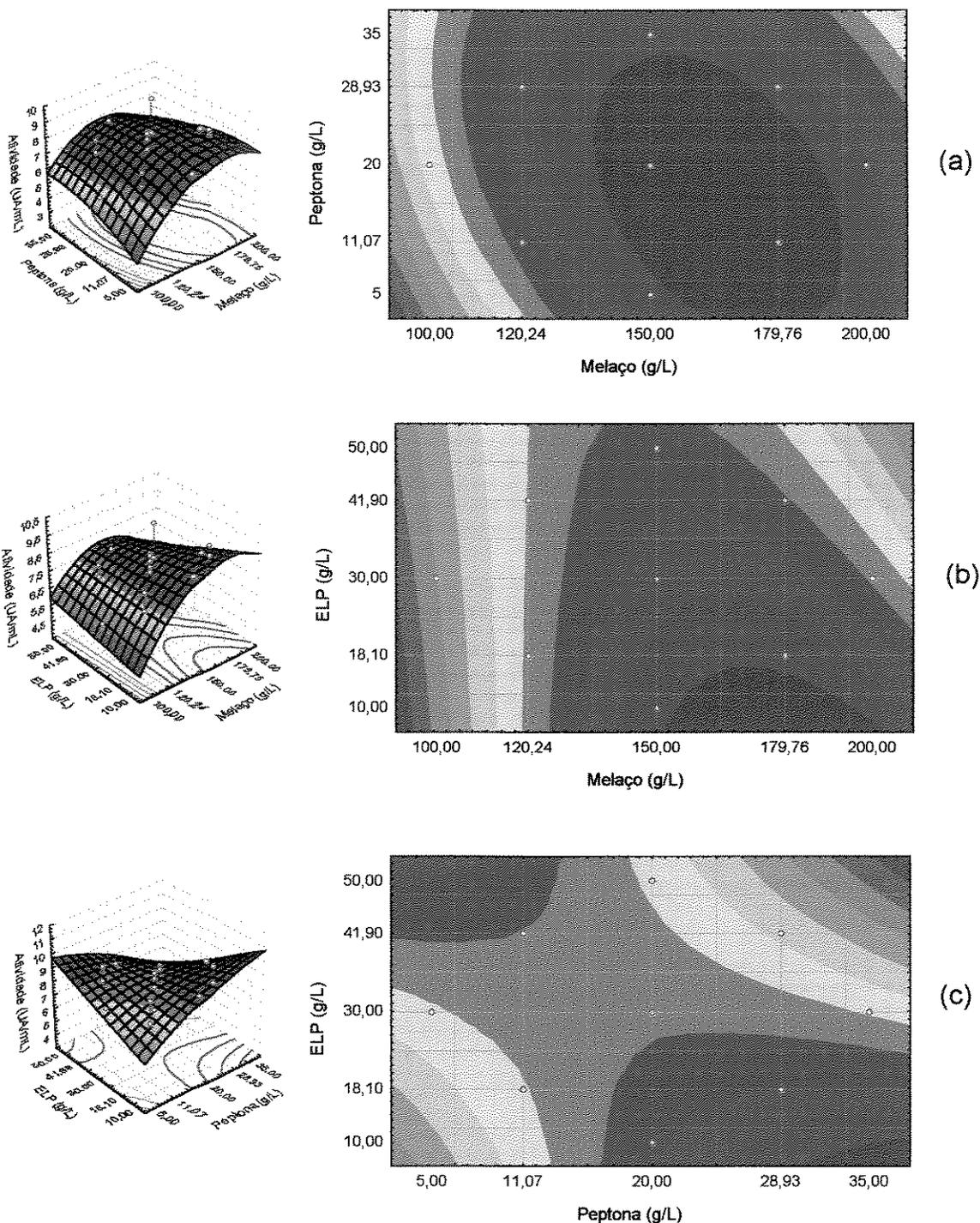


Figura 7: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melão de cana e peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de melão de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao terceiro planejamento.

4.1.5. Quarto planejamento

O quarto planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes melão de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 18 e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 19.

A Tabela 20 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase e a Tabela 21, a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,94 e o teste F (8,75 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados excelentes a 95% de nível de confiança, e permitem obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 4).

$$\begin{aligned} \text{Atividade} = & 7,28 - 1,05.\text{Melaço} - 2,38.\text{Melaço}^2 - 1,56.\text{Peptona}^2 - \\ & 1,69.\text{ELP}^2 - 0,68.\text{Melaço}.\text{Peptona} \end{aligned} \quad (4)$$

Tabela 18: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao quarto planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	4,23
2	+1	-1	-1	3,97
3	-1	+1	-1	5,07
4	+1	+1	-1	3,87
5	-1	-1	+1	4,85
6	+1	-1	+1	4,23
7	-1	+1	+1	5,53
8	+1	+1	+1	3,15
9	-1,68	0	0	4,89
10	+1,68	0	0	3,27
11	0	-1,68	0	6,14
12	0	+1,68	0	4,32
13	0	0	-1,68	5,19
14	0	0	+1,68	4,91
15	0	0	0	7,47
16	0	0	0	7,12
17	0	0	0	7,19

Tabela 19: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao quarto planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana (g/L)	110,00	130,24	160,00	189,76	210,00
Peptona (g/L)	5,00	11,07	20,00	28,93	35,00
ELP (g/L)	5,00	9,05	15,00	20,95	25,00

Tabela 20: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao quarto planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	7,28	0,10	69,51	0,000
(1) Melaço (L)*	-1,05	0,10	-10,66	0,009
Melaço (Q)*	-2,38	0,11	-21,91	0,002
(2) Peptona (L)	-0,40	0,10	-4,06	0,056
Peptona (Q)*	-1,56	0,11	-14,39	0,005
(3) ELP (L)	0,02	0,10	0,23	0,843
ELP (Q)*	-1,69	0,11	-15,54	0,004
1L x 2L*	-0,68	0,13	-5,26	0,034
1L x 3L	-0,38	0,13	-2,99	0,096
2L by 3L	-0,28	0,13	-2,19	0,159

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 21: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, peptona Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao quarto planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	24,84	04	6,21	28,53
Resíduos	2,61	12	0,28	
Falta de Ajuste	2,55	10	0,25	
Erro Puro	0,07	02	0,03	
Total	27,45	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,94$

$F_{0,95;4;12} = 3,26$

Após a análise da ANOVA, o modelo para a atividade de glicosiltransferase foi utilizado para construir as superfícies de resposta. As Figuras 8(a), 8(b) e 8(c) ilustram os efeitos dos componentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD® na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12. Verificou-se que os componentes peptona Difco (40,0 g/L) e extrato de carne (4,0 g/L) do meio de cultivo 1, descrito por Moraes (2002), podem ser substituídos por peptona bacteriológica Biobrás (20,0 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15,0 g/L).

Utilizando-se meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20,0 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L) foi obtido 7,26 UA/mL de glicosiltransferase na fermentação pela linhagem de *Erwinia* sp D12. O custo aproximado deste meio de cultivo é R\$7,06 por litro.

Usando-se o meio de cultivo 1 descrito por Moraes (2002), composto de melaço de cana (120,0 g/L), peptona Biobrás (40,0 g/L) e extrato de carne Biobrás (4,0 g/L) foi obtido 7,67 UA/mL de glicosiltransferase na fermentação pela linhagem de *Erwinia* sp D12. O custo aproximado do meio de cultivo é R\$15,62 por litro.

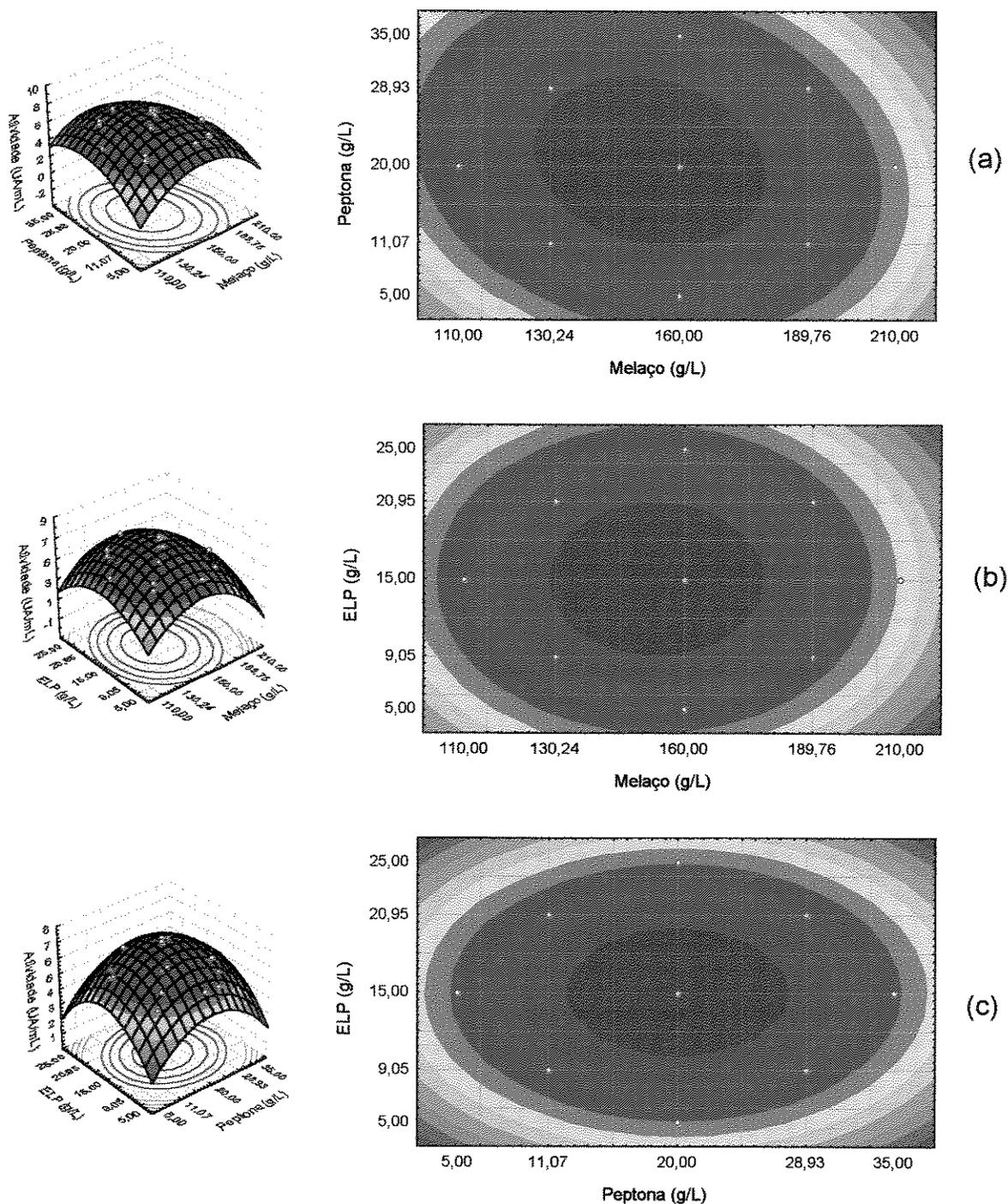


Figura 8: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de Melão de cana e Peptona bacteriológica Biobrás, (b) em função da concentração de Melão de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de Peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao quarto planejamento.

4.2. Estudo da otimização do meio de cultivo utilizando-se melão de cana, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Para o estudo do efeito dos componentes água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] em substituição à peptona Difco e extrato de carne do meio de cultivo 1, proposto por Moraes (2002), foram realizados três planejamentos composto central visando à otimização do meio de cultivo como descrito no item 3.3.2.

As Tabelas 22 a 35 e as Figuras 9 a 11 ilustram os resultados dos planejamentos experimentais visando à substituição dos componentes peptona Difco (40,0 g/L) e extrato de carne (4,0 g/L) do meio de cultivo 1, proposto por Moraes (2002), por componentes alternativos, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12.

4.2.1. Primeiro planejamento

O primeiro planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes estudadas melão de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 22, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 23.

Analisando-se os valores de atividade obtidos, na Tabela 22, verifica-se um incremento nos valores de atividade enzimática, variando de 0,53 UA/mL para o ensaio 8 (129,76 g/L de melão, 77,86 g/L de AMM e 16,77 g/L de ELP) até uma atividade máxima de 5,73 UA/mL, para o ensaio 13 (100,00 g/L de melão, 60,00 g/L de AMM e 4,00 g/L de ELP) e ensaio 14 (100,00 g/L de melão, 60,00 g/L de AMM e 20,00 g/L de ELP).

Tabela 22: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	AMM	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	3,50
2	+1	-1	-1	4,46
3	-1	+1	-1	3,67
4	+1	+1	-1	5,28
5	-1	-1	+1	3,49
6	+1	-1	+1	5,32
7	-1	+1	+1	3,78
8	+1	+1	+1	0,53
9	-1,68	0	0	3,27
10	+1,68	0	0	1,43
11	0	-1,68	0	4,92
12	0	+1,68	0	3,19
13	0	0	-1,68	5,73
14	0	0	+1,68	5,73
15	0	0	0	4,97
16	0	0	0	5,10
17	0	0	0	5,40

Tabela 23: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana (g/L)	50,00	70,24	100,00	129,76	150,00
AMM (g/L)	30,00	42,14	60,00	77,86	90,00
ELP (g/L)	4,00	7,23	12,00	16,77	20,00

A Tabela 24 apresenta o efeito das variáveis sobre a atividade da glicosiltransferase. A AMM e o ELP apresentaram efeitos negativos significativos na atividade enzimática. Estes resultados indicam que o aumento das concentrações da AMM e do ELP, na composição do meio de cultivo, provocaria um decréscimo da atividade enzimática. O melão, individualmente, não teve efeito significativo na atividade enzimática, porém, sua interação com a AMM e o ELP afetaram negativamente a atividade de glicosiltransferase. Assim, no próximo planejamento foram utilizados níveis menores de concentração dos três componentes de meio de cultivo.

Tabela 24: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melão de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

	Efeito UA/mL	Desvio Padrão	t(2)	p	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	5,17	0,13	40,52	0,001	4,62	5,72
(1) Melão (L)	-0,29	0,12	-2,39	0,139	-0,80	0,23
Melão (Q)*	-2,09	0,13	-15,80	0,004	-2,66	-1,52
(2) AMM (L)*	-0,94	0,12	-7,84	0,016	-1,46	-0,42
AMM (Q)*	-0,88	0,13	-6,66	0,022	-1,45	-0,31
(3) ELP (L)*	-0,56	0,12	-4,65	0,043	-1,07	-0,04
ELP (Q)	0,31	0,13	2,31	0,147	-0,26	0,87
1L x 2L*	-1,11	0,16	-7,06	0,019	-1,78	-0,43
1L x 3L*	-1,00	0,16	-6,37	0,024	-1,67	-0,32
2L by 3L*	-1,37	0,16	-8,77	0,013	-2,05	-0,70

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

A Tabela 25 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase, e a Tabela 26 a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,79 e o teste F (3,03 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 95% de nível de confiança, permitindo a obtenção de um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 25: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao primeiro planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	5,17	0,13	4,62	5,72
(1) Melaço (L)	-0,14	0,06	-0,40	0,11
Melaço (Q)*	-1,04	0,07	-1,33	-0,76
(2) AMM (L)*	-0,47	0,06	-0,73	-0,21
AMM (Q)*	-0,44	0,07	-0,72	-0,16
(3) ELP (L)*	-0,28	0,06	-0,54	-0,02
ELP (Q)	0,15	0,07	-0,13	0,44
1L x 2L*	-0,55	0,08	-0,89	-0,22
1L x 3L*	-0,50	0,08	-0,84	-0,16
2L by 3L*	-0,69	0,08	-1,02	-0,35

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 26: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao primeiro planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	29,78	06	4,96	9,78
Resíduos	5,07	10	0,51	
Falta de Ajuste	4,98	08	0,62	
Erro Puro	0,10	02	0,05	
Total	34,85	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,79$

$F_{0,95;6;10} = 3,22$

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 5).

$$\text{Atividade} = 5,17 - 1,04.\text{Melaço}^2 - 0,47.\text{AMM} - 0,44.\text{AMM}^2 - 0,28\text{ELP} - 0,55.\text{Melaço}.\text{AMM} - 0,50\text{Melaço}.\text{ELP} - 0,69.\text{AMM}.\text{ELP} \quad (5)$$

Através da análise da Figura 9(a) verifica-se que a atividade enzimática é maior na faixa entre 70 g/L e 130 g/L para o componente melaço e na faixa entre 30 g/L e 75 g/L para o componente AMM. Na Figura 9(b), pode-se observar que a atividade de glicosiltransferase é maior em menores concentrações de ELP. Pela Figura 9(c), verifica-se que a atividade enzimática tende a aumentar em duas direções, uma com aumento da concentração de ELP e diminuição de AMM e outra, com o aumento da concentração de AMM e diminuição de ELP. Deste

modo, no planejamento seguinte, as faixas de concentrações de melaço e de ELP foram aumentadas, enquanto que a de AMM foi diminuída para a obtenção de maior atividade de glicosiltransferase.

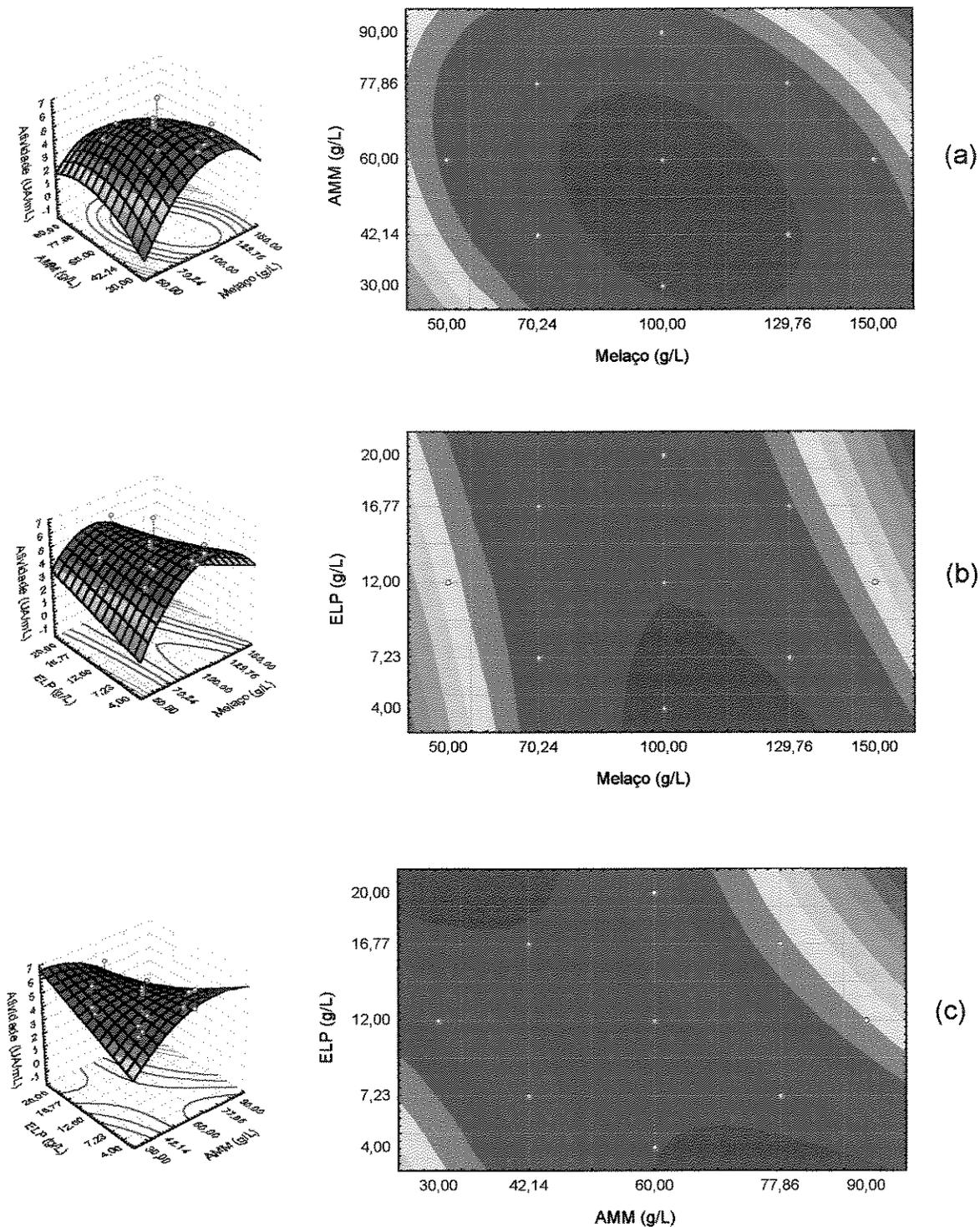


Figura 9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD® e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referentes ao primeiro planejamento.

4.2.2.Segundo planejamento

O segundo planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes estudadas melação de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 27, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 28.

Analisando-se os valores de atividade obtidos, na Tabela 27, verifica-se um incremento nos valores de atividade enzimática quando comparados com o planejamento anterior, variando de 2,64 UA/mL para o ensaio 9 (10,00 g/L de melação, 90,00 g/L de AMM e 5,00 g/L de ELP) até uma atividade máxima de 6,37 UA/mL, para o ensaio 6 (97,74 g/L de melação, 72,14 g/L de AMM e 7,98 g/L de ELP).

Tabela 27: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	AMM	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	2,94
2	+1	-1	-1	5,25
3	-1	+1	-1	2,94
4	+1	+1	-1	3,31
5	-1	-1	+1	3,38
6	+1	-1	+1	6,37
7	-1	+1	+1	4,21
8	+1	+1	+1	4,45
9	-1,68	0	0	2,64
10	+1,68	0	0	4,89
11	0	-1,68	0	4,71
12	0	+1,68	0	3,90
13	0	0	-1,68	4,93
14	0	0	+1,68	4,19
15	0	0	0	4,33
16	0	0	0	4,21

Tabela 28: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana(g/L)	10,00	32,26	65,00	97,74	120,00
AMM (g/L)	60,00	72,14	90,00	107,86	120,00
ELP (g/L)	0,00	2,02	5,00	7,98	10,00

A Tabela 29 apresenta o efeito das variáveis sobre a atividade da glicosiltransferase. Enquanto o melão apresentou efeito positivo significativo, a AMM apresentou efeito negativo na atividade de glicosiltransferase. Estes resultados indicam que o aumento da concentração do melão provocaria um incremento da atividade, e o aumento da concentração de AMM acarretaria a diminuição da atividade enzimática. O componente ELP não afetou individualmente a atividade, nem mesmo quando em interação com os componentes melão e AMM. Assim, no próximo planejamento foram utilizados níveis maiores de concentração de melão e ELP e menores de AMM.

Tabela 29: Estimativa dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (melão de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na produção de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

	Efeito UA/mL	Desvio Padrão	t(1)	p	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	4,28	0,06	72,34	0,009	3,53	5,03
(1) Melão (L)*	1,42	0,05	31,20	0,020	0,84	2,00
Melão (Q)	-0,41	0,06	-7,39	0,086	-1,11	0,29
(2) AMM (L)*	-0,65	0,05	-14,22	0,045	-1,22	-0,07
AMM (Q)	-0,02	0,06	-0,44	0,738	-0,73	0,68
(3) ELP (L)	0,40	0,05	8,82	0,072	-0,18	0,98
ELP (Q)	0,16	0,06	2,89	0,212	-0,54	0,86
1L x 2L*	-1,17	0,06	-19,74	0,032	-1,93	-0,42
1L x 3L	0,14	0,06	2,37	0,254	-0,61	0,90
2L by 3L	0,21	0,06	3,52	0,176	-0,55	0,96

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

A Tabela 30 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase, e a Tabela 31 a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,77 e o teste F (5,75 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 95% de nível de confiança, permitindo a obtenção de um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela 30: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao segundo planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	4,28	0,06	3,53	5,03
(1) Melaço (L)*	0,71	0,02	0,42	1,00
Melaço (Q)*	-0,20	0,03	-0,56	0,15
(2) AMM (L)	-0,32	0,02	-0,61	-0,03
AMM (Q)*	-0,01	0,03	-0,36	0,34
(3) ELP (L)*	0,20	0,02	-0,09	0,49
ELP (Q)*	0,08	0,03	-0,27	0,43
1L x 2L	-0,59	0,03	-0,96	-0,21
1L x 3L	0,07	0,03	-0,31	0,45
2L by 3L*	0,10	0,03	-0,27	0,48

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 31: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao segundo planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	11,04	02	5,52	21,89
Resíduos	3,28	13	0,25	
Falta de Ajuste	3,28	12	0,27	
Erro Puro	0,00	01	0,01	
Total	14,31	15		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,77$

$F_{0,95;2;13} = 3,81$

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade de glicosiltransferase (equação 6).

$$\text{Atividade} = 4,28 - 0,71.\text{Melaço} - 0,32.\text{AMM} - 0,59.\text{Melaço}.\text{AMM} \quad (6)$$

Através da análise da Figura 10(a) verifica-se que a atividade enzimática é maior em maiores concentrações de melaço e menores concentrações de AMM. Na Figura 10(b), pode-se observar que a atividade é maior em maiores concentrações de melaço. Pela Figura 10(c), verifica-se que a atividade enzimática tende a aumentar com diminuição da concentração da AMM. Deste modo, no planejamento seguinte, as faixas de concentrações de melaço e de ELP foram aumentadas, enquanto que a de AMM foi diminuída, visando a otimização do meio de cultivo para o aumento da atividade de glicosiltransferase.

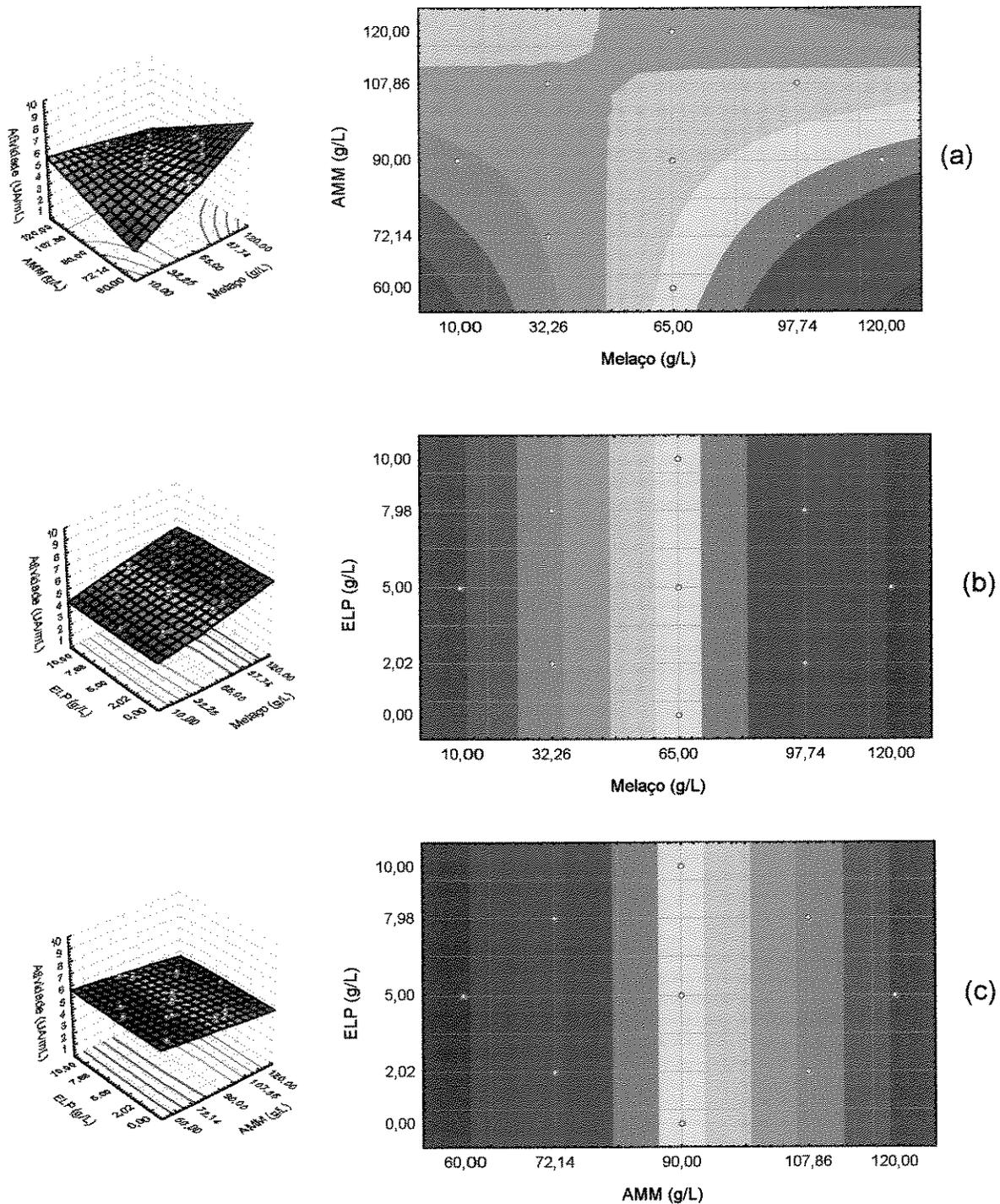


Figura 10: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referentes ao segundo planejamento.

4.2.3. Terceiro planejamento

O terceiro planejamento composto central utilizado para avaliar as variáveis independentes estudadas melação de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], que tinha como variável dependente a atividade de glicosiltransferase, apresenta-se na Tabela 32, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na Tabela 33.

A Tabela 34 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase, e a Tabela 35 a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,72 e o teste F (5,64 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 85% de nível de confiança, e permitem obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade enzimática (equação 7).

$$\text{Atividade} = 6,69 + 0,58.\text{Melaço} - 0,50.\text{Melaço}^2 - 0,37.\text{AMM}^2 + 0,24.\text{ELP} - 0,27.\text{ELP}^2 + 0,33.\text{AMM}.\text{ELP} \quad (7)$$

Tabela 32: Planejamento composto central codificado para estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.

Ensaio	Melaço de cana	AMM	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	4,26
2	+1	-1	-1	5,42
3	-1	+1	-1	4,12
4	+1	+1	-1	5,35
5	-1	-1	+1	4,52
6	+1	-1	+1	5,89
7	-1	+1	+1	5,63
8	+1	+1	+1	7,20
9	-1,68	0	0	4,85
0	+1,68	0	0	6,42
11	0	-1,68	0	5,77
12	0	+1,68	0	6,27
13	0	0	-1,68	6,53
14	0	0	+1,68	6,04
15	0	0	0	6,30
16	0	0	0	6,69
17	0	0	0	6,95

Tabela 33: Valores decodificados utilizados no planejamento composto central no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço de cana(g/L)	50,00	70,24	100,00	129,76	150,00
AMM (g/L)	20,00	36,19	60,00	83,81	100,00
ELP (g/L)	2,00	4,43	8,00	11,57	14,00

Tabela 34: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase, referentes ao terceiro planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -85%	Limite de Confiança +85%
Média*	6,69	0,19	6,26	7,13
(1) Melaço (L)*	0,58	0,09	0,38	0,79
Melaço (Q)*	-0,50	0,10	-0,73	-0,28
(2) AMM (L)	0,22	0,09	0,02	0,43
AMM (Q)*	-0,37	0,10	-0,59	-0,14
(3) ELP (L)*	0,24	0,09	0,03	0,44
ELP (Q)*	-0,27	0,10	-0,50	-0,05
1L x 2L	0,03	0,12	-0,23	0,30
1L x 3L	0,07	0,12	-0,20	0,33
2L by 3L*	0,33	0,12	0,06	0,59

* parâmetros estatisticamente significativos (85% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

Tabela 35: Análise de variância no estudo do efeito dos componentes do meio de cultivo (melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) na atividade de glicosiltransferase, referente ao terceiro planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	11,45	05	2,29	11,5
Resíduos	2,19	11	0,20	
Falta de Ajuste	1,97	09	0,21	
Erro Puro	0,22	02	0,11	
Total	13,65	16		

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,72$

$F_{0,85;5;11} = 2,04$

Após a análise da ANOVA, o modelo para a atividade de glicosiltransferase foi utilizado para construir as superfícies de resposta.

As Figuras 11(a), 11(b) e 11(c) ilustram os efeitos dos componentes melaço de cana, água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12.

Utilizando-se meio de cultivo 3 otimizado composto de melaço de cana (100,0 g/L), água de maceração de milho (60,0 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (8,0 g/L) foi obtido 6,65 UA/mL de glicosiltransferase na fermentação pela linhagem de *Erwinia* sp D12. O custo aproximado deste meio de cultivo é R\$0,20 por litro.

Usando-se o meio de cultivo 1, descrito por Moraes (2002), composto de melaço de cana (120,0 g/L), peptona Biobrás (40,0 g/L) e extrato de carne Biobrás (4,0 g/L) foi obtido 7,67 UA/mL de glicosiltransferase na fermentação pela linhagem de *Erwinia* sp D12. O custo aproximado deste meio de cultivo é R\$15,62 por litro.

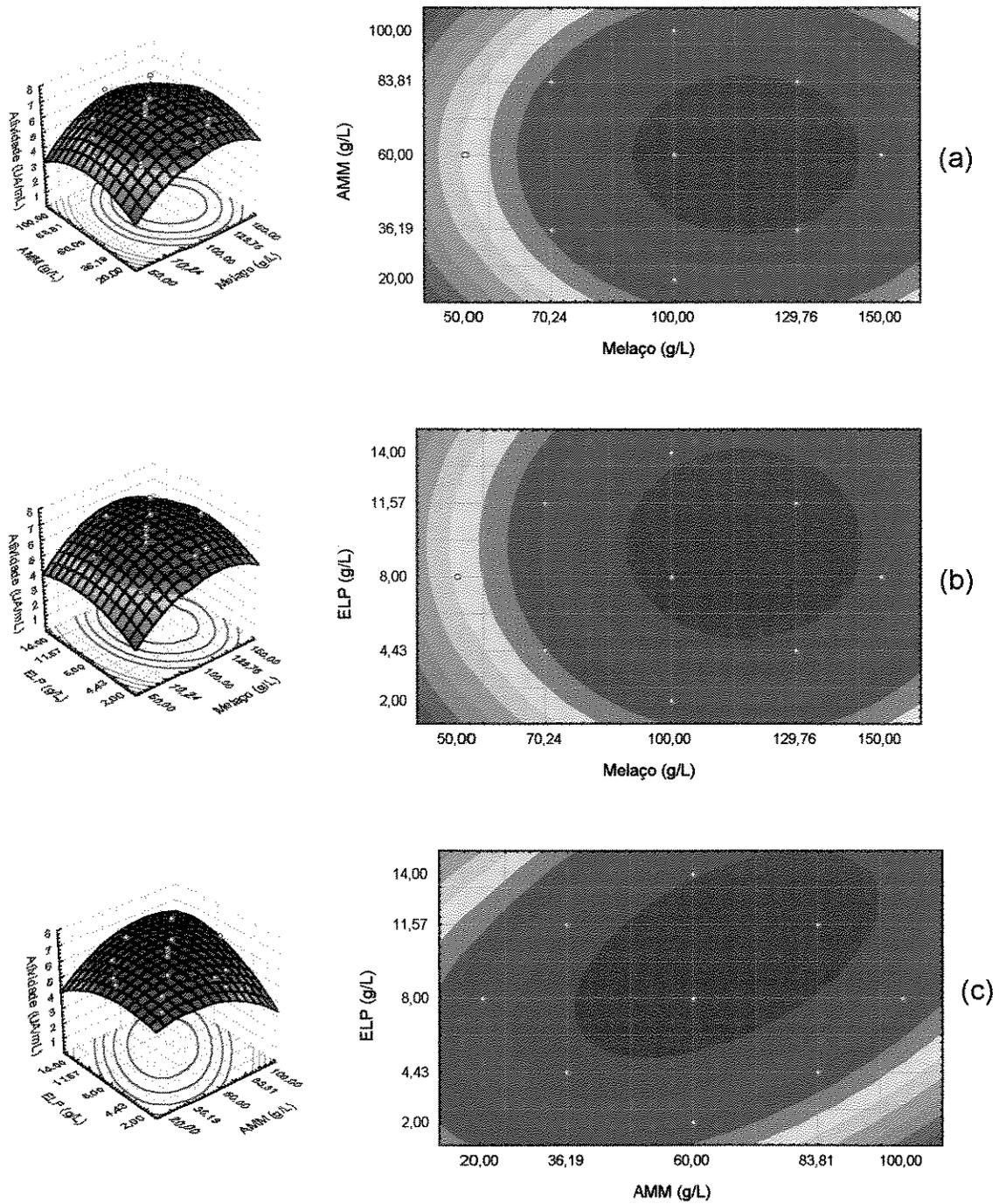


Figura 11: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de glicosiltransferase: (a) em função da concentração de melaço de cana e água de maceração de milho, (b) em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD® e (c) em função da concentração de água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referentes ao terceiro planejamento.

A Tabela 36 ilustra o custo do meio de cultivo 1, descrito por Moraes (2002), e dos meios de cultivo otimizados neste trabalho contendo peptona Biobrás ou água de maceração de milho e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] como fontes alternativas de nitrogênio, em substituição à peptona Difco e extrato de carne Biobrás do meio de cultivo 1.

O meio de cultivo 2, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L) pode ser utilizado para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12. Neste meio de cultivo foi obtida atividade de glicosiltransferase igual a 7,26 UA/mL, sendo que o custo foi estimado em cerca de R\$7,06 por litro de meio de cultivo.

A produção de glicosiltransferase no meio de cultivo 2 (7,26 UA/mL) foi pouco menor do que no meio de cultivo 1, descrito por Moraes (7,67 UA/mL); no entanto, o custo dos componentes do meio de cultivo 2 é cerca de 2 vezes menor que o meio de cultivo 1.

O meio de cultivo 3, composto de melaço de cana (100 g/L), água de maceração de milho (60 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (8 g/L) pode ser utilizado para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12. Neste meio de cultivo foi obtida atividade de glicosiltransferase igual a 6,65 UA/mL, sendo que o custo foi estimado em cerca de R\$ 0,20 por litro de meio de cultivo.

A produção de glicosiltransferase, no meio de cultivo 3 (6,65 UA/mL), foi menor do que no meio de cultivo 1, descrito por Moraes (7,67 UA/mL), no entanto, o custo dos componentes do meio de cultivo 3 é cerca de 78 vezes menor que o meio de cultivo 1.

Para os experimentos posteriores realizados neste trabalho, referentes ao estudo de crescimento de *Erwinia* sp D12 em fermentador de 5 litros, e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio, optou-se por utilizar o meio de cultivo 2 otimizado (160 g/L de melaço, 20 g/L de peptona e 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]) por apresentar atividade de glicosiltransferase maior do que o meio de cultivo 3

otimizado e principalmente por não apresentar resíduo insolúvel que poderiam afetar negativamente a imobilização celular.

Tabela 36: Custo do meio de cultivo para a produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12.

	Meio de cultura g/L	Custo R\$/L	Custo Total R\$/L	Atividade de Glicosiltransferase UA/mL	R\$/UA
Meio 1	Melaço – 120,0 g/L	0,041			
(Moraes 2002)	Peptona Biobrás– 40,0 g/L	13,54	15,62	7,67	2,04
	Extrato de carne Biobrás – 5,0 g/L	2,04			
Meio 2	Melaço – 160 g/L	0,054			
(neste trabalho)	Peptona Biobrás – 20 g/L	6,79	7,06	7,26	0,97
	ELP* – 15 g/L	0,22			
Meio 3	Melaço – 100 g/L	0,034			
(neste trabalho)	AMM** – 60 g/L	0,042	0,20	6,65	0,03
	ELP* – 8 g/L	0,120			
	K ₂ HPO ₄ – 0,1 g/L	0,004			

*ELP: extrato de levedura Prodex Lac SD® (Prodesa Produtos Especiais para Alimentos S/A)

**AMM: água de maceração de milho (Corn Products Brasil)

4.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo 2 e produção de glicosiltransferase pela linhagem de *Erwinia* sp D 12 em fermentador de 5 litros, a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em meio de cultivo 2 otimizado, composto de melaço de cana (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.4.

As Tabelas 37, 38, 39 e 40 e as Figuras 12, 13, 14 e 15 ilustram, respectivamente, a relação entre o tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultivo, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase a 24°C, 26°C, 28°C e a 30°C.

A Figura 12 e a Tabela 37 mostram que na fermentação a 24°C, a produção de glicosiltransferase intracelular pela linhagem *Erwinia* sp D12 foi verificada na fase exponencial de crescimento e atingiu atividade máxima de 14,01 UA/mL após 11 horas de fermentação. Após este período, foi observada uma queda da atividade de glicosiltransferase, sendo que após 24 horas de fermentação a atividade diminuiu para 9,42 UA/mL.

Tabela 37: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 L, a 24°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	2,10	1,05	6,0
4	3,72	1,41	5,9
6	5,73	3,22	5,9
7	7,09	5,41	6,1
8	8,79	7,64	6,1
9	9,85	10,04	6,1
10	10,34	13,40	6,1
11	10,61	14,01	6,1
13	11,02	11,81	6,1
24	12,23	9,42	6,0

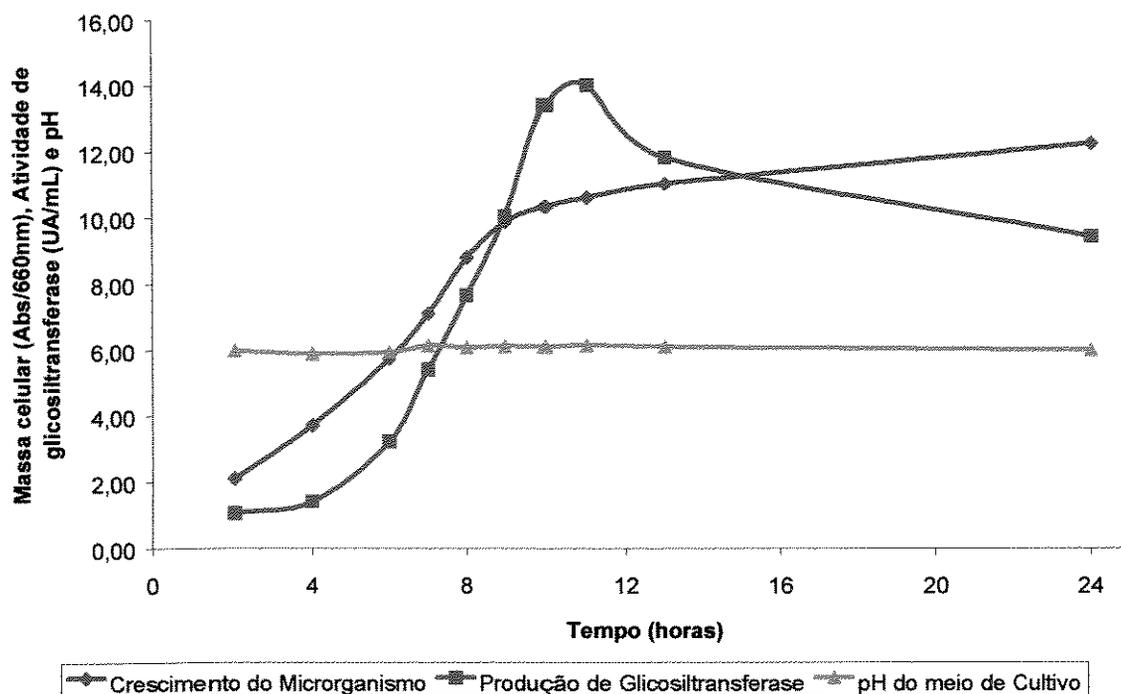


Figura 12: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 24°C.

A Figura 13 e a Tabela 38 ilustram que na fermentação a 26°C, a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 ocorreu na fase exponencial de crescimento atingindo atividade máxima de 14,61 UA/mL após 10 horas de fermentação. Posteriormente, observou-se uma queda da atividade de glicosiltransferase, sendo que após 24 horas de fermentação foi obtido 11,2 UA/mL.

Tabela 38: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 L, a 26°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	2,01	0,78	5,9
4	4,64	1,36	5,8
6	6,55	4,59	5,8
7	7,60	6,14	5,7
8	10,23	9,73	5,7
9	11,24	13,31	5,7
10	12,05	14,61	5,7
11	11,74	13,23	5,6
13	12,31	11,38	5,5
24	11,66	11,20	5,6

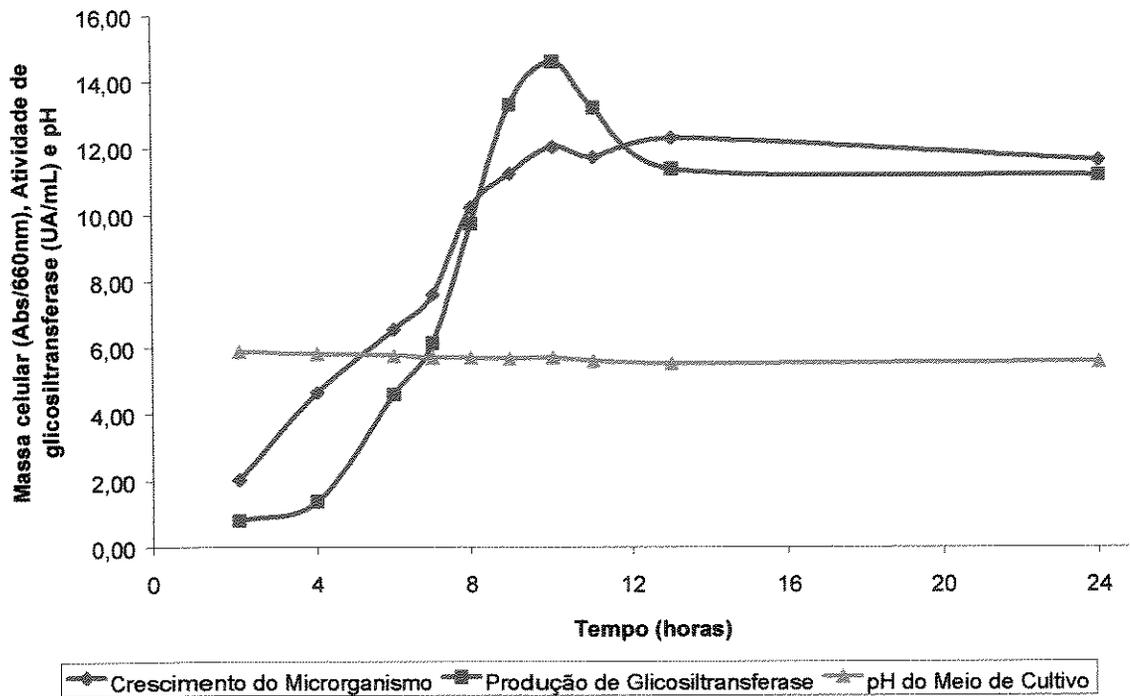


Figura 13: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 26°C.

A Figura 14 e a Tabela 39 ilustram que na fermentação pela linhagem *Erwinia* sp D12 a 28°C, a produção de glicosiltransferase ocorreu na fase exponencial de crescimento e que atingiu atividade máxima de 12,20 UA/mL após 10 horas de fermentação. Após este período, houve uma diminuição gradativa da atividade enzimática, atingindo um valor de 9,16 UA/mL após 24 horas de fermentação.

Tabela 39: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 L, a 28°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	0,54	0,54	5,9
4	2,00	2,00	5,8
6	7,49	7,49	5,7
7	10,30	10,30	5,6
8	10,57	10,57	5,6
9	12,11	12,11	5,7
10	12,20	12,20	5,6
11	11,53	11,53	5,5
13	11,77	11,77	5,5
24	9,16	9,16	5,5

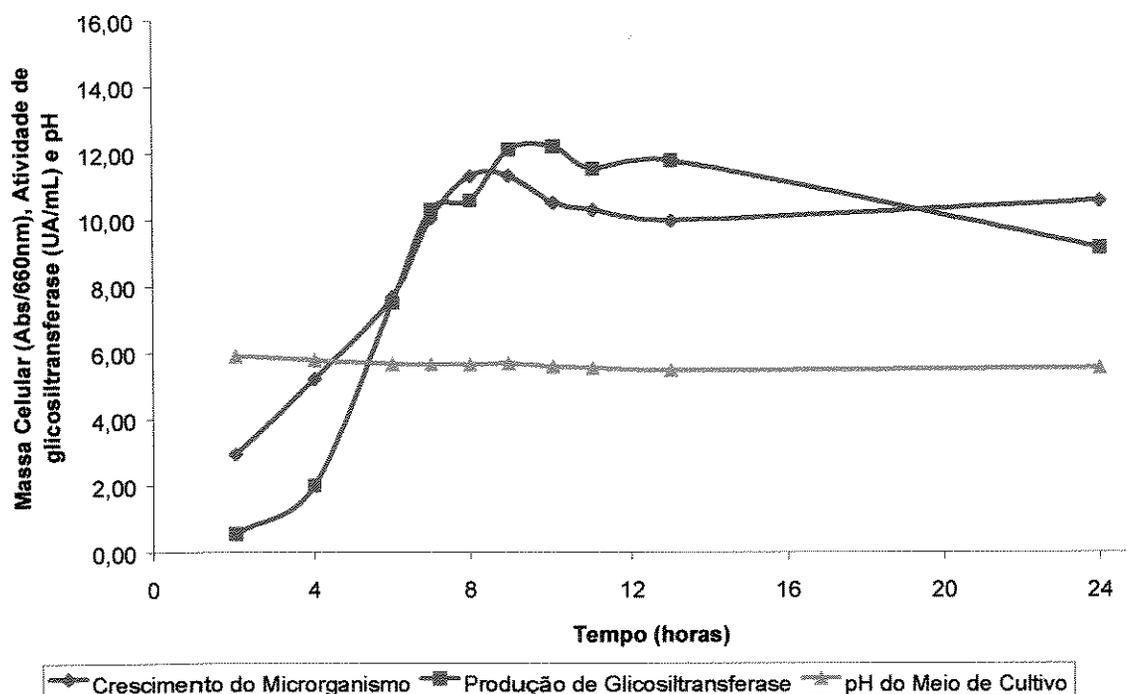


Figura 14: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 28°C.

A Figura 15 e a Tabela 40 mostram que a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 a 30°C, ocorreu na fase exponencial de crescimento alcançando atividade máxima de 9,44 UA/mL após 9 horas de fermentação. Observou-se uma diminuição de atividade enzimática, sendo que foi obtido 8,23 UA/mL após 24 horas de fermentação.

Tabela 40: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Erwinia* sp D12 em meio de cultivo 2 composto de melaço (160,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 L, a 30°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/mL)	pH
2	2,84	0,70	5,8
4	5,78	2,60	5,6
6	8,01	6,97	5,6
7	12,01	9,37	5,6
8	11,00	9,35	5,6
9	11,18	9,44	5,5
10	11,13	8,78	5,5
11	11,34	8,15	5,5
13	11,63	8,16	5,4
24	11,06	8,23	5,4

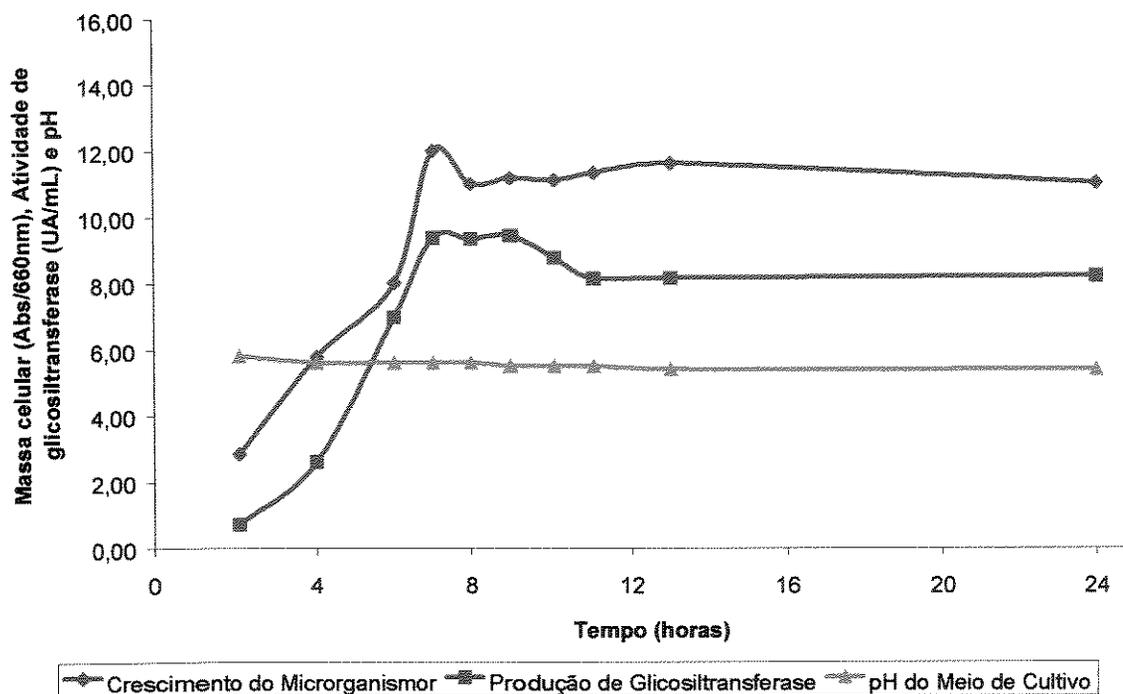


Figura 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo 2 a 30°C.

A Tabela 41 ilustra que obteve-se maior produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 nas temperaturas de 24°C e 26°C, em meio de cultivo 2 otimizado composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), sendo obtido respectivamente 14,01 UA/mL e 14,61 UA/mL.

Tabela 41: Produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, em meio de cultivo 2 otimizado composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (15 g/L), em fermentador de 5 litros, a 24°C, 26°C, 28°C e 30°C.

Temperatura	Atividade de Glicosiltransferase (UA/mL)	Tempo de Fermentação (horas)
24°C	14,01	11
26°C	14,61	10
28°C	12,20	10
30°C	9,44	9

4.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de *Erwinia* sp D 12, em processo em batelada

A conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se os sistemas de enzima livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, no processo em batelada, foi estudada como descrito no item 3.6.

4.4.1. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre

No estudo da conversão de sacarose utilizando-se glicosiltransferase livre, obtida por ultrasonicação de 2 g de células de *Erwinia* sp D12, foi obtida 10,24 g de isomaltulose a partir de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v), após 12 horas de reação a 30°C (Tabela 42).

4.4.2. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de *Erwinia* sp D12

A Tabela 42 ilustra a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se 2 g de células livres ou células imobilizadas, contendo 2 g de células, de *Erwinia* sp D12.

Após 12 horas de reação a 30°C, foram obtidos 6,86 g e 5,27 g de isomaltulose nas misturas de reação contendo 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v) e células livres; e 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v) e células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio, sendo que, após incubação com novas alíquotas de 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v) foram obtidos 6,50 g e 5,72 g de isomaltulose, respectivamente.

Após 24 horas de reação, utilizando-se células livres e células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 foram obtidos respectivamente, 13,36 g e 10,99 g de isomaltulose.

A conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase livre foi maior em relação a utilização de células livres e células imobilizadas nas primeiras 12 horas de reação, no entanto, as células livres e células imobilizadas permitem sua reutilização no processo de conversão de sacarose em isomaltulose, o que não é possível com a glicosiltransferase livre.

Obteve-se maior conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12 quando comparada com as células imobilizadas. Isto pode ser devido à maior superfície de contato com a solução de sacarose e maior facilidade de difusão da sacarose utilizando-se células livres.

Tabela 42: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se enzima livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, em processo em batelada.

Tempo de Reação (horas)	Enzima Livre Isomaltulose (g)	Célula Livre Isomaltulose (g)	Célula Imobilizada Isomaltulose (g)
12	10,24	6,86	5,27
24	-	6,50	5,72
Total	10,24	13,36	10,99

4.5. Estudo da imobilização das células de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio

4.5.1. Imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em diferentes alginatos de sódio e conversão de sacarose em isomaltulose, em processo em batelada

O estudo da imobilização das células de *Erwinia* sp D12 em diferentes alginatos de sódio, visando à substituição do alginato de sódio Sigma por outro alginato de menor custo, foi realizado como descrito no item 3.7.1. Neste estudo, após cada coleta de amostra, as alíquotas de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v) foram repostas por novas alíquotas de 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v).

A Tabela 43 e a Figura 16 mostram que utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 em 1,0% de alginato de sódio Sigma, Synth e Vetec foram obtidas respectivamente, 24,79%, 22,92% e 18,54% de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação. Nas amostras obtidas após a terceira adição de 50 mL de solução de sacarose 35,0% (p/v), referente a 48 horas de uso das células imobilizadas em soluções 1,0% de alginatos de sódio Sigma, Synth e Vetec, foram obtidas porcentagens de conversão de sacarose em isomaltulose iguais a 13,46%, 10,91% e 14,66%, respectivamente.

A Tabela 44 e Figura 16 ilustram que utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 em 1,5% de alginato de sódio Sigma, Synth e Vetec foram obtidas respectivamente, 29,57%, 24,49% e 23,71% de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação. Nas amostras obtidas após a terceira adição de 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v), referente a 48 horas de uso das células imobilizadas em soluções 1,5% de alginatos de sódio Sigma, Synth e Vetec, foram obtidas porcentagens de conversão de sacarose em isomaltulose iguais a 18,82%, 16,28% e 11,58%, respectivamente.

A Tabela 45 e Figura 16 ilustram que utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 em 2,0% de alginato de sódio Sigma, Synth e Vetec, foram obtidas respectivamente, 26,14%, 23,97% e 22,54% de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação. Nas amostras obtidas após a terceira adição de 50 mL de solução de sacarose 35% (p/v), referente a 48 horas de uso das células imobilizadas em soluções 2,0% de alginatos de sódio Sigma, Synth e Vetec, foram obtidas porcentagens de conversão de sacarose em isomaltulose iguais a 19,44%, 12,87% e 11,47%, respectivamente.

Foi obtida maior conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de sódio de alta viscosidade Sigma, no entanto, considerando-se o alto custo desse reagente, poderia ser utilizado alginato de sódio Synth, em substituição ao alginato de sódio Sigma, na concentração 1,5% ou 2,0% para a imobilização das células.

Tabela 43: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (1,0%), em processo em batelada.

Amostra	Tempo (horas)	Alginato Sigma 1,0% Conversão (%)	Alginato Synth 1,0% Conversão (%)	Alginato Vetec 1,0% Conversão (%)
1 ^a	24	24,79	22,92	18,54
2 ^a	36	22,92	15,14	12,45
3 ^a	48	13,46	10,91	7,71

Tabela 44: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (1,5%), em processo em batelada.

Amostra	Tempo (horas)	Alginato Sigma 1,5% Conversão (%)	Alginato Synth 1,5% Conversão (%)	Alginato Vetec 1,5% Conversão (%)
1 ^a	24	29,57	24,49	23,71
2 ^a	36	20,86	14,76	16,59
3 ^a	48	18,82	16,28	14,66

Tabela 45: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio (2,0%), em processo em batelada.

Amostra	Tempo (horas)	Alginato Sigma 2,0% Conversão (%)	Alginato Synth 2,0% Conversão (%)	Alginato Vetec 2,0% Conversão (%)
1 ^a	24	26,14	23,97	22,54
2 ^a	36	24,80	21,69	13,89
3 ^a	48	19,44	12,87	11,47

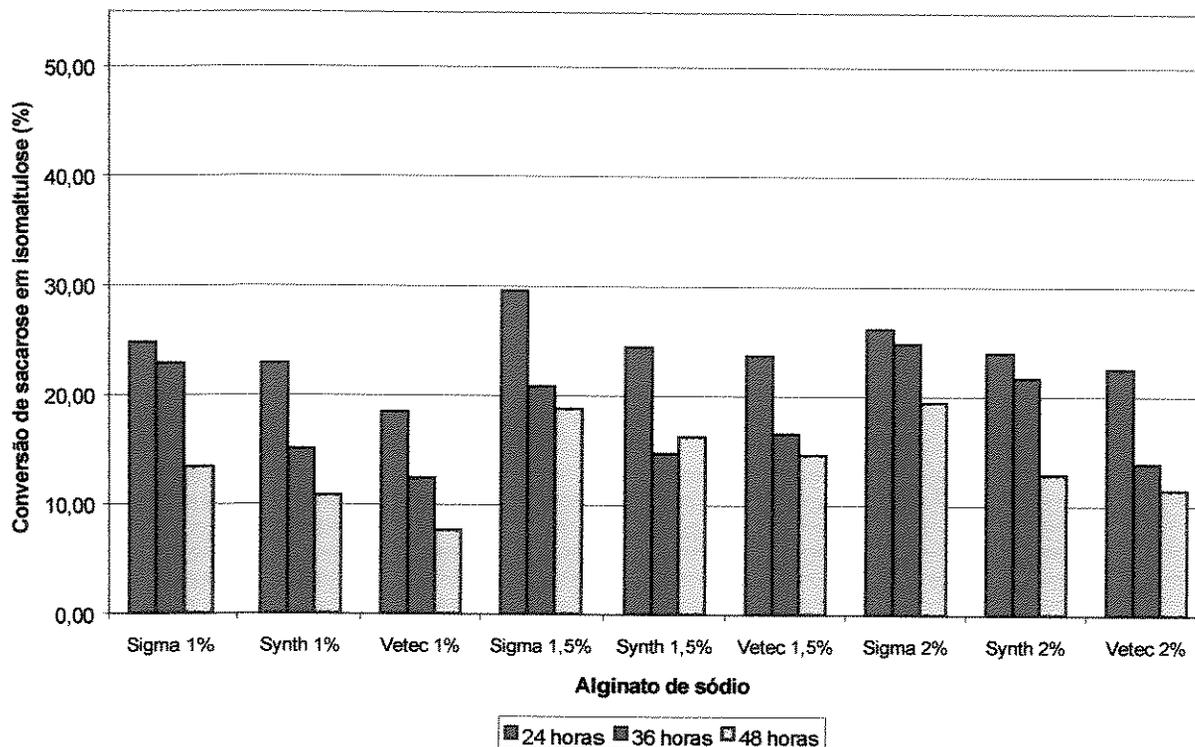


Figura 16: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em diferentes concentrações e tipos de alginato de sódio, em processo em batelada.

4.5.2. Imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em alginatos de sódio Synth e Sigma, em diferentes concentrações e conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

A Tabela 46 e Figura 17 ilustram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12, imobilizadas em alginato de sódio Synth 1,5% e 2,0% e alginato de sódio Sigma 1,5%, em bioreator.

Verifica-se que a conversão de sacarose em isomaltulose, para células imobilizadas em alginato de sódio Sigma 1,5%, variou de 16,52% a 23,67%. Nas primeiras 12 horas atingiu-se 16,52% de conversão, com máxima de 23,67% após 72 horas de reação.

Pode-se observar que a conversão de sacarose em isomaltulose, para células imobilizadas em alginato de sódio Synth 1,5%, variou de 10,64% a 21,16%. Nas primeiras 12 horas atingiu-se 15,91% de conversão, com máxima de 21,16% após 48 horas de reação e após 72 horas, um mínimo de 10,64% de conversão.

Observa-se ainda que a conversão de sacarose em isomaltulose, para células imobilizadas em alginato de sódio Synth 2,0%, variou de 15,81% a 52,62%. Nas primeiras 12 horas atingiu-se um máximo de 52,62% de conversão, e após 72 horas, um mínimo de 15,81% de conversão.

Pode-se concluir que o alginato de sódio Sigma na concentração de 1,5% pode ser substituído pelo alginato de sódio Synth na concentração de 2,0%, obtendo-se maiores taxas de conversão de sacarose em isomaltulose.

Tabela 46: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Sigma 1,5% e Synth 1,5% e 2,0%, em bioreator.

Tempo (horas)	Sigma 1,5% Conversão (%)	Synth 1,5% Conversão (%)	Synth 2,0% Conversão (%)
24	16,52	15,91	52,62
36	19,39	15,44	45,40
48	19,42	21,16	28,03
60	18,06	12,59	21,14
72	23,67	10,64	15,81

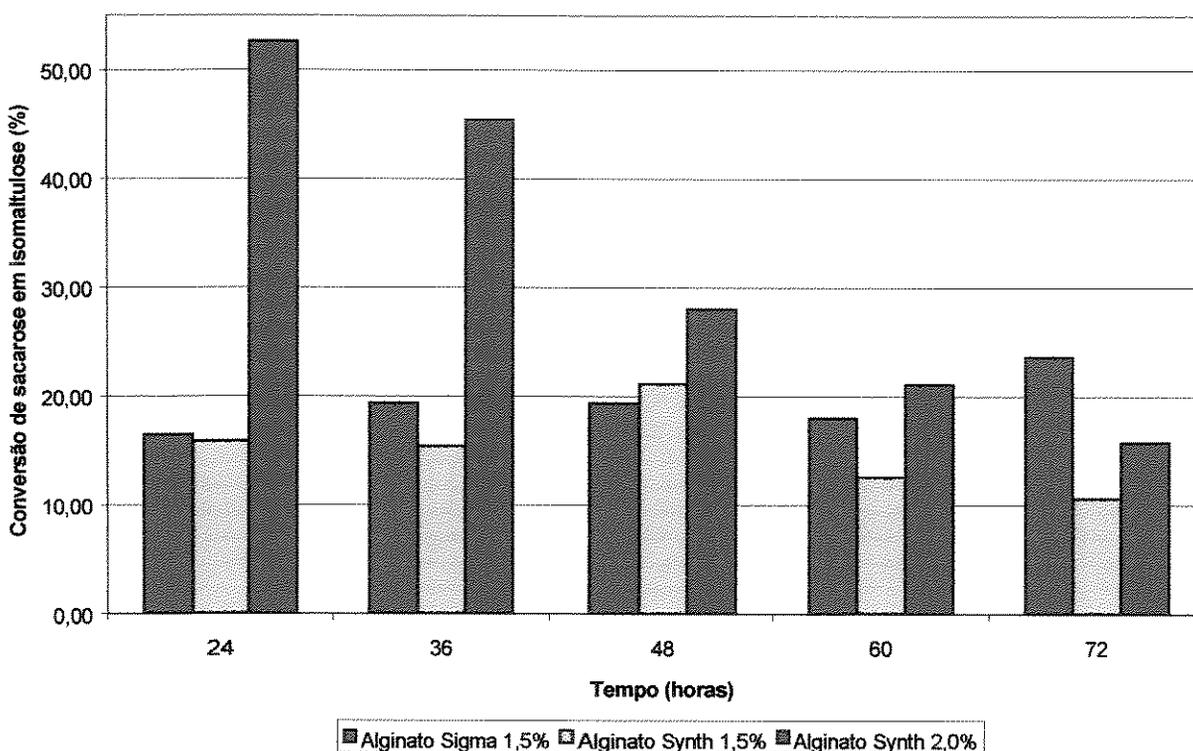


Figura 17: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, em alginato de cálcio Sigma 1,5% e alginato de cálcio Synth 1,5% e 2,0%, em bioreator.

4.5.3. Efeito da concentração de células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator

A Tabela 47 e a Figura 18 ilustram a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas contendo diferentes concentrações de massa celular.

Utilizando-se suspensões 20%, 30% e 40% (g de massa celular úmida/volume), para a imobilização de células em alginato de cálcio, foram obtidos valores de conversão máxima de sacarose em isomaltulose de 52,62%, 61,17% e 64,06%, respectivamente.

Observou-se que o aumento da concentração de células nos grânulos de células imobilizadas resultou em aumento da conversão de sacarose em isomaltulose e que a taxa de conversão tende a diminuir com o tempo de reação.

Tabela 47: Valores de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Erwinia* sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Synth 2,0%, em bioreator.

Tempo (horas)	Suspensão de Massa	Suspensão de Massa	Suspensão de Massa
	Celular 20% (p/v) Conversão (%)	Celular 30% (p/v) Conversão (%)	Celular 40% (p/v) Conversão (%)
12	16,99	26,73	19,33
24	52,62	61,17	64,06
36	45,40	39,71	45,99
48	28,03	31,14	44,25
60	21,14	22,37	33,42
72	15,81	16,65	24,78
84	10,72	12,50	23,39
96	10,59	11,28	21,30

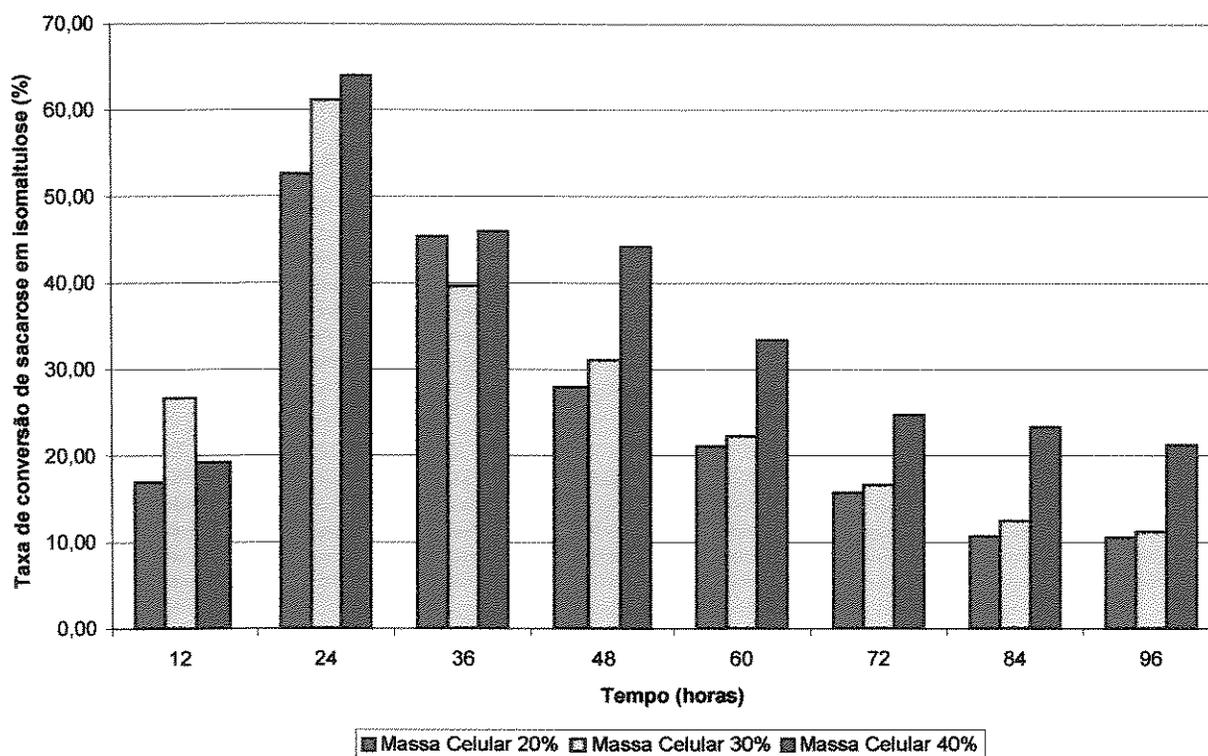


Figura 18: Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Erwinia* sp D12, imobilizadas em alginato de cálcio Synth 2,0%, em bioreator.

4.5.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, em bioreator, com recirculação de substrato

Utilizando-se suspensão 40,0% de células de *Erwinia* sp D12 (massa celular úmida/volume) e solução 2,0% de alginato de sódio Synth, para a imobilização de células, foi obtida 74,18% de conversão da sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação, a 30°C.

A figura 19 ilustra a cromatografia líquida de alta eficiência dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pelas células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio.

Não foi detectada sacarose na mistura de açúcares, sendo que foi observada a formação de outro açúcar, diferente da isomaltulose. Foi detectada, em menores quantidades, a presença de frutose e glicose na mistura de açúcares.

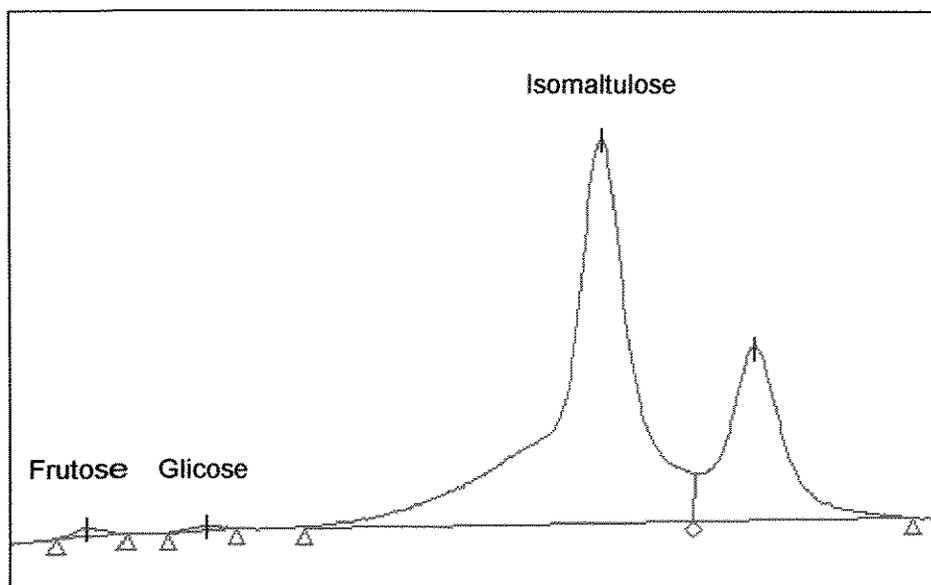


Figura 19: Cromatografia líquida de alta eficiência dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pelas células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio.

Huang et al. (1998) verificaram que a enzima denominada isomaltulose sintase, proveniente da bactéria *Klebsiella planticola* CCRC 19112, converte a sacarose em isomaltulose (76,0%-84,0%), trealulose (14,0%-16,0%) e traços de glicose (2,0%-6,0%) e frutose (2,0%-3,0%).

Celestino (1998) utilizando a enzima glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e solução de sacarose 5,0% e 10,0% (p/v) obteve rendimentos de 73,5% e 72,3% de isomaltulose, respectivamente, após 4 horas de reação, a 40°C.

Heikkila et al. (2000) descreveram a conversão enzimática de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77.

A sacarose foi convertida em 82,0% de isomaltulose, 8,8% de trealulose, 3,3% de frutose, 2,0% de glicose e 3,9% de oligossacarídeos.

5. Conclusões

No estudo da otimização do meio de cultivo de *Erwinia* sp D12 para a produção de glicosiltransferase, em frascos sob agitação, utilizando-se melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás e extrato de levedura Prodesa Lac LD[®], foi obtida maior produção de glicosiltransferase 7,26 UA/mL, em meio de cultivo 2, composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás (20 g/L) e extrato de levedura Prodesa Lac SD[®] (15 g/L), após 15 horas de fermentação, a 30°C.

Verificou-se que, no estudo da otimização do meio de cultivo de *Erwinia* sp D12 para a produção de glicosiltransferase, em frascos sob agitação, foi obtida 6,65 UA/mL, em meio de cultivo 3, composto de melaço de cana (100 g/L), água de maceração de milho (60 g/L) e extrato de levedura Prodesa Lac SD[®] (8 g/L), após 15 horas de fermentação, a 30°C.

No estudo da relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo 2 e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em fermentador de 5 litros, foi obtida maior produção de glicosiltransferase 14,61 UA/mL, a 26°C, após 10 horas de fermentação. Nas temperaturas de 24°C, 26°C, 28°C e 30°C, foram obtidas respectivamente, atividade de glicosiltransferase iguais a 14,01 UA/mL, 14,61 UA/mL, 12,20 UA/mL e 9,44 UA/mL.

No estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se enzima livre, células livres e células imobilizadas em alginato de cálcio, de *Erwinia* sp D12, em processo em batelada, foi obtido maior taxa de conversão utilizando-se células livres e células imobilizadas.

No estudo da imobilização de células de *Erwinia* sp D12, em alginato de cálcio, verificou-se que as soluções 1,0% e 1,5% de alginato de sódio Sigma, de alta viscosidade, podem ser substituídas por solução 2,0% de alginato de sódio Synth, de menor custo. Na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio Sigma 1,5% e Synth 1,5% e 2,0%, em

bioreator, foram obtidas respectivamente, 23,67%, 21,16% e 52,92% de conversão máxima.

No estudo sobre o efeito da concentração de células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, foi obtida maior conversão 64,06% após 24 horas, utilizando-se suspensão celular 40% (g de massa celular úmida/mL).

Utilizando-se suspensão 40,0% de células de *Erwinia* sp D12 (g de massa celular úmida/mL) e solução 2,0% de alginato de sódio Synth para a imobilização de células em bioreator, foi obtida 74,18% de conversão da sacarose em isomaltulose, após 24 horas de reação, a 30°C.

6.Sugestões para trabalhos futuros

Estudo da produção de massa celular de *Erwinia* sp D12 para aplicação na conversão enzimática de açúcar cristal em isomaltulose, utilizando-se meio de cultivo 3 composto de melaço de cana (100 g/L), água de maceração de milho (60 g/L), extrato de levedura Prodesa Lac SD® (8 g/L) e K₂HPO₄ (0,1 g/L).

Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12. Efeito da concentração de sacarose e de nutrientes na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células livres de *Erwinia* sp D12.

Estudo da imobilização de células de *Erwinia* sp D12. Efeito da adição de polietilenoimina e glutaraldeído na estabilidade da glicosiltransferase. Estudo da vida útil das células imobilizadas de *Erwinia* sp D12.

7.Referências Bibliográficas

1. AGA, H.; SHIBUYA, T.; FUKUDA, S.; MIYAKE, T. Saccharide composition comprising maltooligosylturanose and maltooligosylpalatinose, its preparation and uses. JP. n.810363, 3 mar.1997, 26 jan. 1999.
2. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose**. UK. n.201.462, 28 out.1982, 16 nov.1982.
3. CELESTINO, E. M. Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose. Campinas, 1998. 74p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
4. CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C. e CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, Whiteknights, v.27, p.471-481, jul., 1984.
5. CHEETHAN, P. S. J.; IMBER, C. E. e ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, Whiteknights, v.299, p.628-631, out., 1982.
6. CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. e ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.415s-420s, 2001.
7. DEGELMANN, H.; KOWALCZYK, J.; KUNZ, M.; SCHUTTNHELM, M. **Process for the hydrogenation of sugars**. DE. n.004801, 9 jan.1998, 15 ago. 2000.
8. DERVAKOS, G. A. e WEBB, C. On the merits of viable-cell immobilisation. **Biotechnology Advanced**, London, v.9, p.559-612, 1991.
9. DUFLOT, P; FOUACHE, C., **Method for producing palatinitol**. FR. n.860721, 12 set.2001, 20 mar. 2001.
- 10.ERTESVAG, H. e VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, Trondheim, v.59, p.85-91, jun., 1998.

11. GODSHALL, M. A. How carbohydrates influence food flavors. **Food Technology**, New Orleans, v.51, n.1, p.63-66, jan., 1997.
12. GOLDSCHER, R.L., **Process for the manufacture of isomaltitol**. IL. n.489027, 9 jun.1995, 21 out. 1997.
13. GRENBY, T. H. Nutritive sucrose substitutes and dental health. In: GREENBY, T.H. New York. **Developments in Sweeteners**. 1983. v. 2, p.51-89.
14. HASHIMOTO, H.; YAMADA, K. e YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl b-D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, Yokohama, v.9, n.12, p.849-854, out., 1987.
15. HAVENAAR, R. Dental advantages of some bulk sweeteners in laboratory animal trials. In: GREENBY, T.H. New York. **Developments in Sweeteners**. 1987. v. 3, p.189-211.
16. HEIKKILA, H.; SARKKI, M.; LINDROOS, M.; OJALA, P.; RAVANKO, V.; TYLLI, M. **Process of the production of isomaltulose and other products**. FI. n.082555, 21 mai.1998, 14 nov. 2000.
17. HERTEL, S.; HEINZ, F. e VOGEL, M. Hydrolysis of low-molecular-weight oligosaccharides and oligosaccharide alditols by pig intestinal sucrase/isomaltase and glucosidase/maltase. **Carbohydrate Research**, Obrigheim, v.326, p.264-276, dez., 2000.
18. HUANG, J. H.; HSU, L. H. e SU, Y.-C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Taipei, v.21, p.22-27, jul, 1998.
19. KAKINUMA, H.; YUASA, H. e HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alfa-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydrate Research**, Yokohama, v.312, p.103-115, ago., 1998.
20. KASHIMURA, J.; KIMURA, M. e ITOKAWA, Y. The effects of Isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats.

- Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, Kyoto, v.42, p.69-76, nov., 1996.
21. KAWAI, K.; OKUDA, Y. e YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. **Endocrinology Japonica**, Ibaraki, v.32, n.6, p.933-936, ago., 1985.
22. KAWAI, K.; YOSHIKAWA, H.; MURAYAMA, Y.; OKUDA, Y. e YAMASHITA, K. Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. **Hormone and Metabolic Research**, Ibaraki-ken, v.21, p.338-340, fev., 1989.
23. KHAN, R. Chemical and enzymic transformations of sucrose. **International Sugar Journal**, Trieste, v.96, n.1141, p.12-17, 1994.
24. LANTERO, O.J. Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*. US. n.82109404.2, 12 out.1982, 04 mai. 1983.
25. LICHTENTHALER, D. W. Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. **Carbohydrate Research**, Darmstadt, v.313, p.69-89, jul., 1998.
26. LINA, B. A. R.; SMITS-VAN PROOIJJE, A. E. e WAALKENS-BERENDSEN, D. H. Embryotoxicity/ teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Zeist, v.35, out., 1997.
27. LINKE, H. A. B. Sweeteners and dental health: the influence of sugar substitutes on oral microorganisms. In: GREENBY, T.H. New York. **Developments in Sweeteners**. 1987. v. 3, p.151-189.
28. LOO, J. V.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VLIET, T. V. e HEUVEL, E. V. D. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII-CT94-1095). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.121-132, set., 1999.

29. LUND, B. M. e WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General Microbiology**, Norfolk, v.78, p.330-336, abr., 1973.
30. MCALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. e FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, Dublin, v.12, n.9, p.667-672, jul., 1990.
31. MORAES, A. L. L. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia sp* D12 imobilizada em alginato de cálcio. Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
32. MOREIRA, R. F. A. e MARIA, C. A. B. D. Glicídios no mel. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.24, n.4, p.516-525, out., 2001.
33. MOYNIHAN, P. J. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. **Journal of Dentistry**, Newcastle, v.26, n.3, p.209-218, jan., 1998.
34. NAGAI, Y.; SUGITANI, T. e TSUYUKI, K.-I. Characterization of alpha-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Kanagawa, v.58, n.10, p.1789-1793, mar., 1994.
35. NDINDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C. e REMON, J. P. Characterization and evaluation of isomalt performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, Harelbekestraat, v.189, p.113-124, jul., 1999.
36. NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 3.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.
37. NISHIMOTO, T.; CHAEN, H.; FUKUDA, S.; MIYAKE, T. **Saccharide composition containing trealulose, its preparation and uses**. JP. n.057562, 9 abr.1998, 20 out. 1998.

38. OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N. e HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, Tokyo, v.39, n.1, p.43-49, 1983.
39. PARK, J. K. e CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-319, 2000. Taejon.
40. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T. e PUPIN, A. M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v.14, n.37, p.547-551, jul., 1992.
41. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T. e SATO, H. H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, Campinas, v.27, p.131-136, 1996.
42. SARKKI, MARJA-LEENA; HEIKKILA, HEIKKI; VILJAVA, TAPIO. Immobilization of microorganisms on weakly basic anion exchange substance for producing isomaltulose. 16 mai.1997, 17 ago. 1999.
43. SASAKI, N.; TOPITSOGLOU, V.; TAKAZOE, I. e FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E- 49. **Sweden Dental Journal**, Huddinge, v.9, p.149-155, 1985.
44. SCHIWECK, H.; STEINLE, G.; HABERL, L., **Processo para obtenção de isomaltita**. BR. n.02665/73, 12 abr.1973, 27 jun. 1974.
45. SCHIWECK, H., STEINLE, G., MULLER, L., GAU, W., MUNIR, M. Glucopyranosido-1,6-mannitol, a process for producing the same and its use as a sugar substitute. DE. n.21.252, 16 mar.1979, 11 nov. 1980.
46. SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glicosiltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. JP. n.8124779, 21 ago.1981, 10 mar. 1982.
47. SNODIN, D. J. The toxicology and safety evaluation of non-nutritive sweeteners. In: GRENBY, T.H.; PARKER, K.J.; LINDLEY, M.G. **Developments in Sweeteners**. 1983. v. 2, p.157-179.

48. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biology and Chemistry**, n.160, p.61-68, 1945.
49. STRÄTER, P. J. Palatinol-Technological and processing characteristics. In: Lyn O'Brien Nabors and Robert C. Gekardi. **Alternative Sweeteners**. 1985. p.217-245.
50. TAKAZOE, I. Palatinol- an isomeric alternative to sucrose. In: GRENBY, T. H. **Progress in Sweeteners**. 1989. p.143-167.
51. TAKAZOE, I. New trends on sweeteners in Japan. **International Dental Journal**, Tokyo, v.35, n.1, p.58-65, 1985.
52. TAKAZOE, I.; FROSTELL, G.; OHTA, K.; TOPITSOGLOU, V. e SASAKI, N. Palatinol-a sucrose substitute. **Sweden Dental Journal**, Tokyo, v.9, p.81-87, 1985a.
53. TAKAZOE, I.; OHTA, K.; SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. **Low-cariogenic sweeteners**. JP. 14 jul.1983, 3 dez. 1985b.
54. TAKAZOE, I.; OHTA, K.; SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. **Low-cariogenic sweeteners**. JP. n.8131880, 22 out.1981, 12 mai. 1982.
55. THOMPSON, J.; ROBRISH, S. A.; PIKIS, A.; BRUST, A. e LICHTENTHALER, F. W. Phosphorylation and metabolism of sucrose and its five linkage-isomeric alpha-D-glucosil-D-fructoses by *Klebsiella pneumoniae*. **Carbohydrate Research**, Bethesda, v.331, p.149-161, jan., 2001.
56. TOPITSOGLOU, V.; SASAKI, N. e FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinol) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, Huddinge, v.18, p.47-51, 1984.
57. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T. e NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal General Applied Microbiology**, Kawasaki, v.38, p.483-490, jul., 1992.

58. UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella sp* e produção de isomaltulose a partir de sacarose.** Campinas, 1993. 63p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
59. VÉRONÈSE, T. e PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme and Microbial Technology**, Toulouse, v.24, p.263-269, 1999.
60. MONSEN, LEONARDOS & CIA, VILJAVA, T.; HEIKKILA, H.; SARKKI, M. Processos para a isomerização de sacarose em isomaltulose e para a produção de isomalte a partir de sacarose, e veículo adaptado para uso em um processo microbiano para a isomerização de sacarose em isomaltulose. BR. 16 mai.1997, 11 jan. 2001.