

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

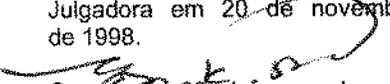
**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
β-FRUTOFURANOSIDASE DE LINHAGEM
MUTANTE DE *Aspergillus niger* E SUA
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS**

JOSÉ LUÍS CONTADO

Orientador: Prof. Dr. Yong Kun Park

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por JOSÉ LUÍS CONTADO Aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de novembro de 1998.


Campinas, 20 de novembro de 1998

Tese apresentada a Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de doutor em Ciência de Alimentos

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TIME	36307
PREÇO	229,99
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2211,00
DATA	27/01/99
N.º CPD	

CM-00120266-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C767p Contado, José Luís
 Produção e caracterização da β -frutofuranosidase de linhagem mutante de *Aspergillus niger* e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos / José Luís Contado. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

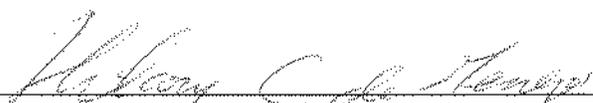
Orientador : Yong Kun Park.
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutooligossacarídeos. 2. β -frutofuranosidase. 3. *Aspergillus niger*. 4. Mutação (Biologia). I. Park, Young Kun. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

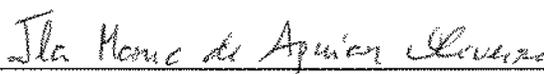
BANCA EXAMINADORA



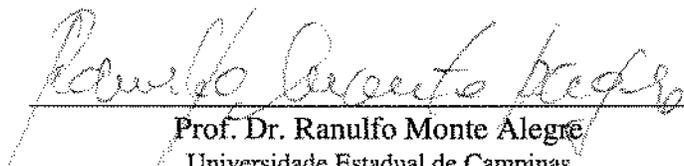
Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Universidade Estadual de Campinas
membro



Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
membro



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Universidade Estadual de Campinas
membro



Profa. Dra. Terezinha de Jesus G. Salva
Instituto de Tecnologia de Alimentos
membro

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Universidade Estadual de Campinas
membro

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Universidade Estadual de Campinas
membro

Dedico ao meu pai
Euclides, *in memoriam*
(1926-1998)

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. **Yong Kun Park**, pela orientação, atenção e apoio prestados na realização deste trabalho e, em especial, na minha formação científica.
- À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela amizade e atenciosidade na revisão desta tese.
- Aos amigos Airton, Ila, Leila, Masaharu, Michel e Yim pelo grande apoio na conduta deste doutorado.
- Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela convivência e amizade durante este período.
- A todos que colaboraram, em algum momento, para a realização deste trabalho.
- A Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, em especial ao Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelo desenvolvimento do trabalho.
- Ao CNPq pela bolsa concessão da bolsa.

INDÍCE

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Frutooligossacarídeos	4
2.2. Benefícios dos frutooligossacarídeos à saúde	5
2.3. Produção de frutooligossacarídeos a partir de sacarose	8
2.4. Microrganismos produtores de β -frutofuranosidase	12
2.5. Produção industrial de frutooligossacarídeos	20
2.6. Mutação em <i>Aspergillus niger</i>	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Seleção de mutantes produtores de β -frutofuranosidase	27
3.1.1. Mutação com N-Metil N'-Nitro N-Nitrosoguanidina (M.N.N.G.)	27
3.1.2. Seleção da linhagem mutante produtora de β -frutofuranosidase	28
3.1.2.1. Determinação da atividade da β -frutofuranosidase pelo teste de Glicose Oxidase	28
3.1.2.2. Determinação quantitativa de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
3.1.3. Mutação por raios ultravioleta (UV)	30
3.2. Estudo da produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	31
3.2.1. Seleção de meios de cultura para produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	31
3.2.2. Estudo da relação da produção da β -frutofuranosidase e alteração do pH do meio em função do tempo de fermentação das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	32
3.3. Produção das β -frutofuranosidases brutas a partir das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	32
3.4. Estudo das características bioquímicas das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	33

3.4.1. Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	33
3.4.2. Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	34
3.4.3. Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	34
3.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	35
3.5. Purificação parcial das β -frutofuranosidases extracelulares das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	36
3.5.1. Preparação da enzima extracelular das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	36
3.5.2. Purificação parcial das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i> , através de Cromatografia em Coluna DEAE-Celulose	36
3.5.3. Obtenção das enzimas purificadas parcialmente	37
3.6. Estudo das características das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	37
3.6.1. Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	38
3.6.2. Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	38
3.6.3. Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	39
3.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	40
3.6.5. Efeito de íons metálicos e de inibidores na atividade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	40

3.6.6. Determinação dos Parâmetros Cinéticos: K_m e $V_{m\acute{a}x}$ das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	41
3.7. Aplicação da β -frutofuranosidase extracelular bruta da linhagem mutante de <i>A. niger</i> na produção de frutooligossacarídeos	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Seleção de mutantes produtores de β -frutofuranosidase	43
4.1.1. Mutação com N-Metil N'-Nitro N-Nitrosoguanidina (M.N.N.G.)	43
4.1.2. Mutação por raios ultravioleta (UV)	47
4.2. Estudo da produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i> ,	49
4.2.1. Seleção dos meios de cultura para produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	49
4.2.2. Estudo da relação da produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH do meio em função do tempo de fermentação das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	50
4.3. Produção das β -frutofuranosidases brutas a partir de linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	53
4.4. Estudo das características bioquímicas das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	53
4.4.1. Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	53
4.4.2. Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	55
4.4.3. Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	56
4.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	57
4.5. Produção e purificação parcial das β -frutofuranosidases extracelulares das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	59

4.5.1. Produção das enzimas extracelulares das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	60
4.5.2. Purificação parcial das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i> , através de Cromatografia em Coluna DEAE-Celulose	60
4.6. Estudo das características das β -frutofuranosidase extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	65
4.6.1. Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	65
4.6.2. Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	66
4.6.3. Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	68
4.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	69
4.6.5. Efeito de íons metálicos e de inibidores na atividade das β -frutofuranosidase purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	70
4.6.6. Determinação dos parâmetros cinéticos: K_m e V_{max} das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	73
4.7. Aplicação da β -frutofuranosidase extracelular bruta da linhagem mutante de <i>A. niger</i> na produção de frutooligossacarídeos	75
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1: Cultivo das linhagens mutante e parental de <i>Aspergillus niger</i> em meio PDA	45
Figura 2: Cultivo das linhagens mutante e parental de <i>Aspergillus niger</i> em meio semi-sólido de farelo de trigo	45
Figura 3: Características morfológicas dos esporos da linhagem mutante de <i>Aspergillus niger</i> cultivados em meio PDA (250 X)	46
Figura 4: Características morfológicas dos esporos da linhagem parental de <i>Aspergillus niger</i> cultivados em meio PDA (125 X)	46
Figura 5: Estudo de diferentes meios de cultura quanto a produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	50
Figura 6: Estudo da relação entre o tempo de fermentação, produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH do meio da linhagem mutante de <i>A. niger</i>	51
Figura 7: Estudo da relação entre o tempo de fermentação, produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH do meio da linhagem parental de <i>A. niger</i>	52
Figura 8: Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases bruta das linhagens mutantes e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	54
Figura 9: Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases bruta das linhagens mutantes e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	55
Figura 10: Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases bruta das linhagens mutantes e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	57
Figura 11: Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases bruta das linhagens mutantes e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	58
Figura 12: Cromatografia da β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>Aspergillus niger</i> em coluna de DEAE-Celulose	61
Figura 13: Cromatografia da β -frutofuranosidase da linhagem parental de <i>Aspergillus niger</i> em coluna de DEAE-Celulose	62

- Figura 14: Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*. 66
- Figura 15: Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*. 67
- Figura 16: Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*. 68
- Figura 17: Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*. 70
- Figura 18: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de β -frutofuranosidases extracelulares purificadas das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*. 74
- Figura 19: Conversão de sacarose em frutooligossacarídeos, glicose e frutose da linhagem mutante de *A. niger* em 24 horas de reação com sacarose 10%. 79
- Figura 20: Conversão de sacarose em frutooligossacarídeos, glicose e frutose da linhagem mutante de *A. niger* em 24 horas de reação com sacarose 30%. 79
- Figura 21: Conversão de sacarose em frutooligossacarídeos, glicose e frutose da linhagem mutante de *A. niger* em 24 horas de reação com sacarose 40%. 80
- Figura 22: Conversão de sacarose em frutooligossacarídeos, glicose e frutose da linhagem mutante de *A. niger* em 24 horas de reação com sacarose 50%. 80

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1: Taxa de sobrevivência de esporos quando expostos ao mutagênico M.N.N.G.	43
Tabela 2: Taxa de sobrevivência de esporos após irradiados com raios ultravioleta	47
Tabela 3: Atividade de β -frutofuranosidase das linhagens mutante e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	48
Tabela 4: Fluxograma de produção, purificação e armazenamento das enzimas β -frutofuranosidase extracelular das linhagens mutante e parental de <i>A. niger</i>	59
Tabela 5: Etapas da purificação de β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>Aspergillus niger</i>	63
Tabela 6: Etapas da purificação de β -frutofuranosidase da linhagem parental de <i>Aspergillus niger</i>	64
Tabela 7: Efeito de inibidores na atividade da β -frutofuranosidase purificada das linhagens mutante e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	71
Tabela 8: Efeito de íons metálicos na atividade da β -frutofuranosidase purificada das linhagens mutante e parental de <i>Aspergillus niger</i> .	72
Tabela 9: Conversão de sacarose 10% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>A. niger</i>	77
Tabela 10: Conversão de sacarose 30% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>A. niger</i>	77
Tabela 11: Conversão de sacarose 40% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>A. niger</i>	78
Tabela 12: Conversão de sacarose 50% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de <i>A. niger</i>	78

RESUMO

Frutooligossacarídeos, ou Neosugar, são oligômeros de sacarose, constituídos de uma molécula de glicose unida com 2, 3 ou 4 unidades de frutose por ligação β -2,1, resultando em estruturas designadas como 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^f-frutofuranosil nistose (GF₄), respectivamente. Sabe-se que os frutooligossacarídeos existem naturalmente em muitos tipos de plantas. Podem também ser obtidos a partir de sacarose através da transfrutossilacção catalisada pela enzima β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) de microrganismos.

Frutooligossacarídeos têm-se tornado de grande interesse por estimular o crescimento de bifidobactérias benéficas do trato digestivo, diminuir o teor do colesterol total e lípídeos no soro sanguíneo, reduzir a constipação intestinal, e em geral melhorar a saúde humana. Neosugar é uma mistura de frutooligossacarídeos, 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^f-frutofuranosil nistose (GF₄) e é comercialmente produzido a partir de sacarose usando a β -frutofuranosidase obtida de *A. niger*.

O objetivo deste trabalho foi induzir um mutante de *Aspergillus niger*, utilizando o reagente N-Metil N'-Nitro N-Nitrosoguanidina (M.N.N.G.) e raios ultravioleta (UV), que produzisse uma β -frutofuranosidase com maior atividade de transfrutossilacção para produção de frutooligossacarídeos do que a linhagem parental e comparar as características das duas enzimas.

Uma linhagem mutante (n^o 12) de *A. niger*, obtida pelo tratamento com M.N.N.G.-UV, foi selecionada por apresentar mais que o dobro da atividade β -frutofuranosidase que a linhagem parental. Esta linhagem mutante produziu menos conídea em PDA e mostrou-se morfologicamente diferente apresentando colônias bege.

A β -frutofuranosidase extracelular da linhagem mutante foi purificada cerca de 15,8 vezes em relação a enzima bruta sendo obtido 39,2 % de rendimento. A enzima purificada apresentou atividade específica de 4,26 unidades/mg de proteína. A enzima apresentou pH e temperatura ótimas de atividade na faixa de 5,5-6,0 e 50-55 °C, respectivamente. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 a 6,0 e a temperaturas inferiores a 55 °C. Os valores de K_m e $V_{máx}$ da β -frutofuranosidase para sacarose foram

0,47 M e 1,02 $\mu\text{mol/ml/min}$, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida com 1 mM de N-bromosuccinimida, β -mercaptoetanol, HgCl_2 e I_2 , e com 10 mM de AgNO_3 , após 30 minutos a 55°C.

A β -frutofuranosidase extracelular da linhagem mutante foi purificada cerca de 15,4 vezes em relação a enzima bruta sendo obtido 31,7 % de rendimento. A enzima purificada apresentou atividade específica de 1,66 unidades/mg de proteína. A enzima apresentou pH e temperatura ótima de atividade na faixa de 5,0-6,0 e 50-55 °C, respectivamente. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 a 6,0 e a temperaturas inferiores a 55 °C. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da β -frutofuranosidase para sacarose foram 0,37 M e 1,12 $\mu\text{mol/ml/min}$, respectivamente. A atividade enzimática foi inibida com 1 mM de N-bromosuccinimida, β -mercaptoetanol, HgCl_2 e I_2 , e com 10 mM de AgNO_3 , após 30 minutos à 55°C.

O maior rendimento de frutooligossacarídeos (54,41%) em relação aos açúcares totais foi obtido utilizando-se β -frutofuranosidase e 30% substrato sacarose em tampão citrato-fosfato pH 5,5 após 6 horas de incubação a 55 °C. A concentração de substrato e o tempo de incubação são importantes para obter a proporção de $\text{GF}_2/\text{GF}_3/\text{GF}_4$ desejada.

SUMMARY

Fructooligosaccharides (or Neosugar) are sucrose oligomers, which are composed of glucose attached via a $\beta(2-1)$ linkage to 2, 3 or 4 fructose units. The resulting structures are designated as 1-kestose (GF_2), nystose (GF_3) and 1^f-fructofuranosylnystose (GF_4), respectively. It is known that fructooligosaccharides exist naturally in many kinds of plants. They can also be prepared from sucrose through the transfructosylating action of enzyme β -fructofuranosidase (E.C. 3.2.1.26) obtained from microorganisms.

Fructooligosaccharides have become of major interest due to their growth stimulation of beneficial bifidobacteria in the digestive tract, decrease of total cholesterol and lipid in the serum, relief of constipation, and general improvement of human health. Neosugar is a mixture of the fructooligosaccharides, 1-kestose (GF_2), nystose (GF_3) and 1^f-fructofuranosylnystose (GF_4), and is commercially produced from sucrose using the enzyme β -fructofuranosidase enzyme obtained from *A. niger* ATCC 20611.

The objective of this work was to induce a mutant of *Aspergillus niger*, using M-Methyl N'-Nitro N-Nitrosoguanidine (M.N.N.G.) and ultraviolet light (UV) producing higher β -fructofuranosidase activity for the production of fructooligosaccharides than the parent strain and to study the characteristics of the enzyme.

A mutant strain(n^o 12) of *A. niger*, obtained by treatment with M.N.N.G.-UV, was selected, producing 100% more β -fructofuranosidase than the parent strain. The mutant produced less conidia on PDA and was morphologically different: brownish white colonies.

The extracellular β -fructofuranosidase of the mutant strain was purified about 15.8-fold (40.2% yield) with respect to the crude enzyme preparation, showing a specific activity of 4.26 units/mg protein. It was found that the optimum pH and temperature for activity were 5.5-6.0 and 50-55 °C, respectively. The enzyme was stable from pH 5.0 to 6.0 and at temperatures below 55 °C. The K_m and V_{max} values of the β -fructofuranosidase for sucrose were 0.47 M and 1.02 μ mol/ml/min., respectively. The activity of the enzyme was inhibited by 1 mM by N-bromosuccinimide, β -mercaptoethanol, $HgCl_2$ and I_2 , and by 10 mM $AgNO_3$ after 30 minutes at 55°C.

The extracellular β -fructofuranosidase parent strain was purified about 15.4-fold (38.6 % yield) with respect to the crude enzyme preparation showing a specific activity of 1.66 units/mg protein. It was found that the optimum pH and temperature for activity were 5.0-6.0 and 50-55 °C, respectively. The enzyme was stable from pH 5.0 to 6.0 and at temperatures below 55°C. The enzyme was stable from pH 5.0 to 6.0 and at temperatures below 55 °C. The K_m and V_{max} values of the β -fructofuranosidase for sucrose were 0.37 M and 1.12 $\mu\text{mol/ml/min.}$, respectively. The activity of the enzyme was inhibited by 1 mM by N-bromosuccinimide, β -mercaptoethanol, HgCl_2 and I_2 , and by 10 mM AgNO_3 after 30 minutes at 55°C.

Maximum conversion yield from saccharose to fructo-oligosaccharides (54.41%) was obtained when added β -frutofuranosidase in 30% sucrose, at 55 °C and pH 5.5, for 6 hrs incubation. The production efficiencies of $\text{GF}_2/\text{GF}_3/\text{GF}_4$ depending on sucrose concentration and the reaction time.

1. INTRODUÇÃO

Com as mudanças de hábito que estão ocorrendo na população nas últimas décadas a nível mundial, entre elas viver em grandes centros urbanos, alimentar-se cada vez mais de produtos pré-industrializados ou industrializados de fácil absorção, não exercitar o corpo fisicamente, juntamente com problemas sociais atuais, como má distribuição de renda, viver sobre pressão (estresse) e precariedade do setor de saúde, vem contribuindo para que uma determinada parte da população se alimente de forma inadequada e, conseqüentemente, esteja acima do peso corpóreo e em condições propícias a determinadas doenças (infarto, diabetes, hipertensão, etc).

As indústrias de alimentos têm-se preocupado mais em melhorar o alimento quanto ao sabor, cor e propriedades físico-químicas, visando, simplesmente, torná-los mais atraentes aos consumidores. Conseqüentemente, observou-se um aumento no consumo de alimentos industrializados, promovido em boa parte pela modificação de suas características, principalmente sabor e textura, que aliado aos problemas da vida moderna promoveu o aparecimento de inúmeros distúrbios na saúde humana. Assim, com intuito de prevenir doenças e promover a saúde, vem ganhando em importância no contexto atual os alimentos que apresentam determinados componentes ou substâncias que exerçam uma função biológica, além da nutricional e reológica. Estes alimentos são denominados alimentos funcionais, ou seja, alimentos que têm uma função fisiológica ou bio-moduladora, além das nutricionais e sensoriais (CHILDS, 1994; ARAI, 1996).

A produção de alimentos funcionais vem crescendo significativamente em países como Japão, E.U.A. e na Comunidade Européia, pois atuam na prevenção de patologias e, portanto, promovem o bem-estar do indivíduo. Estima-se um crescimento no mercado internacional de US\$ 8 bilhões em 1994 para 500 bilhões até o ano 2010 (GHERTY, citado por PITT, 1994).

No Brasil, em junho de 1993 foi assinado um convênio entre a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a usina açucareira Da Barra S.A. , visando a produção de frutooligossacarídeos de cadeia curta (GF₂, GF₃ e GF₄) em escala industrial. Entretanto, até os dias de hoje este produto ainda não está no mercado.

Alternativas de novos açúcares disponíveis ao consumidor, como os frutooligossacarídeos (JUNG *et alii*, 1987 e 1989; YUN *et alii*, 1992a, 1993, 1994a e 1995), palatinose (CHEETHAM *et alii*, 1985 e YUN *et alii*, 1992b), ciclodextrinas (PSZCZOLA, 1988), isomaltooligossacarídeos (KOHMOTO *et alii*, 1991 e YUN *et alii*, 1994b) e galactooligossacarídeos (ONISHI *et alii*, 1995), vem promovendo um impacto significativo na indústria de açúcares, devido as suas excelentes vantagens como alimentos funcionais (OKU *et alii*, 1984; McKELLAR & MODLER, 1989; SPIEGEL *et alii*, 1994).

Os frutooligossacarídeos (FOS) de cadeia curta apresentam 20 a 40% do poder dulçor da sacarose, são de baixo valor calórico (1,5 Kcal/g FOS), não cariogênicos, estimulantes da flora microbiana intestinal, não digeríveis no intestino delgado, sendo seletivamente utilizados pelas bactérias do cólon, especialmente as bifidobactérias. Estudos recentes indicam que os frutooligossacarídeos têm efeito favorável no metabolismo de carboidratos e lipídios, semelhante às fibras na dieta. Outros benefícios associados com a ingestão de FOS na microflora intestinal, são: a diminuição do pH intestinal, restrição no crescimento de bactérias patogênicas e putrefativas, redução da constipação intestinal e decréscimo nos níveis de triglicérides e colesterol do soro sanguíneo (OKU *et alii*, 1984; HIDAKA *et alii*, 1986; MODLER *et alii*, 1990b; MURAMATSU *et alii*, 1992; MURAMATSU *et alii*, 1993; CARLSSON *et alii*, 1992; SPIEGEL *et alii*, 1994; MODLER, 1994).

Salientando que há dificuldade em atender o aumento na demanda mundial de frutooligossacarídeos, e que a sua produtividade é obviamente o fator crítico (YUN *et alii*, 1995), a produção de enzimas β -frutofuranosidases microbiana vem sendo um dos alvos de intensas pesquisas científicas, tanto no aspecto da otimização do processo, como no melhoramento genético de microrganismos para aumentar a síntese da enzima

(GRAEL & MENEZES, 1989). DALE (1983) relatou que o principal objetivo da genética microbiana, no campo da biotecnologia, tem sido alterar geneticamente os microrganismos industrialmente importantes para aumentar a eficiência do processo no qual ele é utilizado.

Diante das observações constatadas por KRESLING & STERN (1935) citado por SILVA (1997), de que a técnica de induzir mutações, seguida da seleção de mutantes mais apropriados haver sido utilizada com sucesso; que a linhagem de *Aspergillus niger* ter sido objetivo de estudos através da utilização de agentes mutagênicos, visando o melhoramento da atividade de diversas enzimas, exceto a β -frutofuranosidase, e, finalmente, considerando a necessidade de aumentar a produtividade na obtenção de frutooligossacarídeos (YUN et alii, 1995; GRAAL & MENEZES, 1991), procurou-se selecionar um mutante induzido por M.N.N.G. e U.V. que produzisse β -frutofuranosidase extracelular com maior atividade de transfrutossilação em relação à linhagem parental.

Os objetivos deste trabalho foram induzir um mutante de *Aspergillus niger* a produzir β -frutofuranosidase extracelular com maior atividade de transferência que a linhagem parental; determinar as diferenças morfológicas entre as linhagens mutante e parental; estudar as características bioquímicas das β -frutofuranosidases bruta e purificada das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*; determinar os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da enzima purificada, a influência de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática e a aplicação das β -frutofuranosidases extracelulares bruta na produção de frutooligossacarídeos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Frutooligossacarídeos (FOS) são polímeros de D-frutose unidos através de ligações β -(2 \rightarrow 1) com uma molécula de sacarose terminal. O grau de polimerização pode variar de 2 a 35 unidades. Os frutooligossacarídeos de cadeia curta, comumente denominados “neosugar”, são oligômeros de 1^F -(1- β -frutofuranosil) $_{n-1}$ sacarose, onde n pode variar de 2 a 4, sendo que quando n=2, tem-se 1-kestose (GF₂); quando n=3, a nistose (GF₃) e quando n=4, a 1^F - β -frutofuranosil nistose (GF₄) (OKU *et alii*, 1984). Polímeros de frutose com grau de polimerização maior que 35 são chamados de inulina. Há diversas fontes naturais de frutooligossacarídeos, entre elas vegetais como chicória, alcachofra-de-jerusalém, dália, triticale, cevada, centeio e aspargo, e em alimentos utilizados cotidianamente pelos brasileiros, como banana, alho, mel, cebola, tomate, tubérculos e trigo (BACON & EDELMAN, 1951; EDELMAN & BACON, 1951; HENDERSON *et alii*, 1959; SAUNDERS & WALKER, 1969; SHIOMI *et alii*, 1976 e 1979; HENRY & DARBYSHIRE, 1980; FISHBEIN *et alii*, 1988; LEE *et alii*, 1992; SPIEGEL *et alii*, 1994).

A quantidade de frutooligossacarídeos e o seu grau de polimerização variam grandemente com a sua fonte. Assim, bulbo de dália, chicória e tubérculos de alcachofra-de-jerusalém apresentam quantidade significativa deste carboidrato de reserva, mas com graus de polimerização diferentes, sendo 18 para chicória, acima de 18 para bulbo de dália e inferior a 18 para tubérculos de alcachofra-de-jerusalém. Cereais como trigo e centeio apresentam frutooligossacarídeos com grau de polimerização de 2 a 7, mas a maioria das frutanas são do tipo ramificada com ligações glicosídicas β -2,6 (BACON & EDELMAN, 1951; EDELMAN & BACON, 1951; EDELMAN, 1956; EDELMAN & JEFFORD, 1968; CARPITA *et alii*, 1989; HOUSLEY *et alii*, 1989; MODLER, 1994).

Estudos conduzidos por SPIEGEL *et alii* (1994) e MODLER (1994) constataram que apesar dos alimentos naturais conterem frutooligossacarídeos e considerando os hábitos alimentares usuais, torna-se difícil a ingestão da dose diária recomendada de oligossacarídeos a partir de alimentos naturais, que é de aproximadamente 0,8g/dia/60 Kg de peso corpóreo. Portanto, a ingestão suplementar de oligossacarídeos pode ser benéfico para crianças, idosos, pessoas que ocupam cargos estressantes e para as que desejam manter o sistema digestivo saudável.

2.2. BENEFÍCIOS DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS À SAÚDE

Os frutooligossacarídeos agem como fonte de carboidrato para a flora intestinal, principalmente as bifidobactérias, tendo-se observado que 65% dos frutooligossacarídeos são convertidos a ácidos graxos voláteis, e estes são absorvidos pela mucosa do ceco e cólon, e metabolizados para produzir energia ao hospedeiro, que equivaleria a 1,5 kcal/gFOS. (SPIEGEL *et alii*, 1994; TOMOMATSU, 1994).

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

Assim, os frutooligossacarídeos têm sido recomendados como fatores bifidogênicos. A adição desses açúcares na dieta humana, no mínimo por 15 dias, aumenta em torno de dez vezes a população das bifidobactérias no intestino grosso. Poucas informações são disponíveis com relação aos efeitos fisiológicos dos fatores bifidogênicos em seres humanos, mas foi demonstrada uma redução nos níveis de

colesterol, triglicerídeos, glicose, ácidos graxos livres e pressão sanguínea de pacientes alimentados com 22,5 g de frutooligossacarídeos por dia (YAMASHITA *et alii*, 1984; MODLER *et alii*, 1990b; MODLER, 1994).

Estudos “in vivo” e “in vitro” em ratos demonstram que os frutooligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas digestivas da mucosa intestinal e pâncreas. Quando injetados por via endovenosa, são rapidamente excretados na urina sem degradação, indicando, portanto, nenhuma decomposição pelas enzimas hidrolíticas de órgãos internos. Ratos, quando alimentados com uma dieta contendo frutooligossacarídeos, por um período prolongado, apresentam um aumento significativo no bolo fecal e na excreção de ácidos graxos voláteis, bem como uma redução no trânsito gastrointestinal e nos níveis de triacilgliceróis (OKU *et alii*, 1984; TOKUNAGA *et alii*, 1986 e 1989; McKELLAR & MODLER, 1989; MODLER *et alii*, 1990b; MODLER, 1994; SPIEGEL *et alii*, 1994).

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

Em um trabalho realizado por MODLER (1994), o autor verificou que a adição de “neosugars” à dieta humana (15g/dia) causou um acréscimo de 10 vezes na população de bifidobactérias do intestino grosso. Ao mesmo tempo, houve uma redução de 0,3 unidades no pH intestinal e também um decréscimo na contagem de *Enterobacteriaceae*. HIDAKA *et alii* (1986) conduziram estudos semelhantes e observaram um aumento na produção de ácidos graxos voláteis, quando 8 gramas de “neosugar” foram administrados diariamente.

MODLER (1994) também relatou que a maioria das dietas para animais e humanos parece ser deficiente em fatores bifidogênicos, mas, suplementos contendo frutooligossacarídeos e lactulose estão agora disponíveis no mercado. Frutooligossacarídeos de cadeia curta, cujo grau de polimerização é menor que 6 e são comumente referidos como neosugars, são metabolizados pelas bifidobactérias em velocidade mais reduzida que a lactulose, mas, estes açúcares têm vantagem sobre a lactulose, uma vez que clostrídios e *E.coli* não crescem, ou se desenvolvem lentamente, em meio contendo frutooligossacarídeos. A aplicação de fatores bifidogênicos na alimentação animal é menos problemática do que na humana, pois as linhagens de bifidobactérias de origem animal podem metabolizar frutooligossacarídeos de cadeias longas, cujo grau de polimerização é maior que 6 (McKELLAR & MODLER, 1989).

A administração de frutooligossacarídeos em lugar da ingestão de bifidobactérias vivas apresenta as vantagens de não serem hidrolisados pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal, estimulam o crescimento das bifidobactérias nativas do intestino humano e também não necessitam de algum ambiente específico para serem comercializadas como os microrganismos requerem. As bifidobactérias inibem o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* e *E. coli* (MODLER, 1994; GIBSON *et alii*, 1994 a, b), mas apresentam baixa tolerância à acidez e são anaeróbias (ISHIBASHI & SHIMAMURA, 1993). Estes fatos sugerem que uma dieta suplementada com fatores bifidogênicos deve ser implementada, porém, evidências definitivas da eficácia desses compostos são necessárias, visto que estudos “in vivo” e “in vitro” são variáveis.

Os efeitos benéficos à saúde promovido pela ingestão de frutooligossacarídeos assemelham-se àqueles atribuídos à fibra, pois aumentam o bolo fecal, reduzem o trânsito gastrintestinal, aumentam o volume no lúmen intestinal e podem suprimir a digestão e absorção de nutrientes no intestino, além de exercerem um efeito modulador da flora intestinal (OKU *et alii*, 1984; TOKUNAGA *et alii*, 1986 e 1989; McKELLAR & MODLER, 1989; MODLER *et alii*, 1990b; MODLER, 1994; SPIEGEL *et alii*, 1994; TOMOMATSU, 1994). Contudo, os frutooligossacarídeos não possuem os efeitos físicos da fibra, tais como: aumento na viscosidade, ligação com a água e efeitos espessantes. A contribuição dos frutooligossacarídeos à saúde é devido, principalmente,

as suas características de atuar como fator de crescimento das bifidobactérias. As fibras, especialmente as solúveis em água, parecem, também, contribuir para a saúde humana, através da fermentação. Contudo, até o presente, a falta de estudos detalhados sobre a fermentação das fibras torna difícil a comparação com os frutooligossacarídeos, como fator de crescimento das bifidobactérias. As vantagens dos frutooligossacarídeos sobre as fibras são: menor requerimento diário de frutooligossacarídeos (3g/dia); não causam diarreia nas doses recomendadas; são levemente adocicadas, apresentam melhor textura e sabor, são totalmente solúveis em água, não são viscosos, não se ligam a minerais, são estáveis e mais fáceis de serem incorporados em bebidas e alimentos processados. Algumas publicações relatam os efeitos anticancerígenos das bifidobactérias em testes com pequenos animais. Estes efeitos anticâncer são devidos ao aumento na imunidade causada pelos componentes da parede celular e componentes extracelulares das bifidobactérias (TOMOMATSU, 1994).

Em um artigo publicado por SPIEGEL *et alii* (1994), os autores relataram que a dose efetiva diária de frutooligossacarídeos (forma pura) é de 3,0 g, sendo que a dose mínima requerida de frutooligossacarídeos para induzir diarreia é de 44 g para o homem e 49 g para mulher, enquanto que HIDAKA *et alii* (1986) estipularam que a quantidade eficaz de frutooligossacarídeos necessária para adultos é de cerca de 5 g/dia. Portanto, esses açúcares poderiam ser incorporados como aditivo em determinados alimentos consumidos diariamente pela população, como pães, iogurtes, geléias, etc.

2.3-- PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DA SACAROSE

Frutooligossacarídeos podem ser produzidos a partir da sacarose pela ação das enzimas microbianas β -frutofuranosidase (β -D-frutofuranosideo frutohidrolase) (E.C. 3.2.1.26) ou β -frutossiltransferase (β -D-frutofuranosideo frutossiltransferase) (E.C. 2.4.1.9). O produto final formado será: kestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), ou seja, uma, duas ou três unidades de frutossila são unidas através de ligações

glicosídicas β -2,1 a unidade de frutose da sacarose, respectivamente (BINKLEY & ALTENBURG, 1965; DZIEZAK, 1986; FISHBEIN *et alii*, 1988; LEE *et alii*, 1992; YUN & SONG, 1993). Cada β -frutofuranosidase oriúnda de um microrganismo apresenta um peso molecular diferente de outra espécie microbiana (OHTSUKA *et alii*, 1992; BARTHOMEUF & POURRAT, 1995).

Segundo SHINOHARA (1986), CHEETHAM *et alii* (1989), FUJITA *et alii* (1990a,b; 1994) e DUAN *et alii*, (1994), a β -frutofuranosidase é uma enzima que catalisa a transfrutosilação a partir da sacarose, além de possuir também uma ação hidrolítica. A especificidade do acceptor para a transfrutosilação e as estruturas dos produtos transfrutosilados variam, dependendo da fonte da enzima e das condições de reações. Os doadores e aceptores do grupo frutosila podem ser a sacarose ou outros frutooligossacarídeos, além de outros sacarídeos como a rafinose, melezitose, esteviosídeo, lactose, etc; sendo essencial que a glicose e a frutose estejam ligadas através de ligações glicosídicas α -1,2.

Em 1953 e 1954 diversos trabalhos foram publicados por diferentes autores a respeito da obtenção de frutooligossacarídeos. SHEFFIELD (citado por BACON & BELL, 1953) relatou que a takadiastase, transfrutosidase, invertase de fungo ou glucosacarase, que são preparações enzimáticas obtidas de fungo, agiam transferindo radicais β -frutofuranosil da sacarose tanto para aceptores orgânicos adequados (sacarose) quanto para água. Resultados semelhantes também foram obtidos por BACON (1954) utilizando invertase de levedura.

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

ALBON *et alii* (1953) obtiveram trissacarídeos kestose, um dos oligossacarídeos sintetizados durante a ação da invertase de levedura em soluções concentradas de sacarose, sendo composto de dois radicais de D-frutose e um de D-glicose. Análises feitas nos produtos da clivagem do açúcar metilado mostraram que sua estrutura era um O- α -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 2)O- β -D-frutofuranosil(6 \rightarrow 2) β -D-frutofuranosídeo. No sentido de se estabelecer uma nomenclatura única aos três isômeros de kestose, GROSS *et alii* (1954) sugeriram que a substância G₁ α - β -2-Fru { 1- β -2-Fru { fosse denominada como 1-kestose; G₁ α - β -2-Fru { 6- β -2-Fru { como 6-kestose; e o trissacarídeo não redutor O- β -D-frutofuranosil(2 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 2) β -D-frutofuranosídeo como neokestose. Sabe-se que os três trissacarídeos isômeros, identificados hoje como 1-kestose (1^F- β -frutosilsacarose), 6-kestose (6^F- β -frutosilsacarose) e neokestose (6^G- β -frutosilsacarose), são potenciais intermediários na síntese de oligo e polifrutanas.

A formação de frutooligossacarídeos, via sacarose, foi relatada por JUNG *et alii* (1989) como realizada a partir de reações consecutivas desproporcionais (GF_n + GF_n \rightarrow GF_{n-1} + GF_{n+1}). Quando a sacarose (GF) era utilizada como substrato, somente glicose (G) e 1-kestose (GF₂) eram produzidos inicialmente. A molécula de sacarose agia tanto como doadora ou aceptora da frutose, assim 1 mol de glicose e 1 mol de 1-kestose eram formados, simultaneamente, a partir de 2 moles de sacarose: 2GF \rightarrow GF₂ + G. Reações similares foram obtidas com outros substratos como: 1-kestose e nistose (GF₃), produzindo: 2GF₂ \rightarrow GF₃ + GF e 2GF₃ \rightarrow GF₄ + GF₂, respectivamente, em que GF₄ representa a 1^F frutofuranosil nistose. De acordo com BEALING & BACON (1953), a transferência repetida de frutose à mesma molécula do oligossacarídeo, poderia resultar na formação de frutosanas, que seriam polímeros derivados de resíduos de n-frutose. Entretanto, a formação de mais de quatro unidades de frutose, a partir de extratos de fungo agindo sobre a sacarose, não foi observada.

A presença de glicofrutosanas de baixo peso molecular (GF₂, GF₃ e GF₄) em meio de cultura inoculado com *Fusarium oxysporum* foi relatado por GUPTA & BHATIA (1980). Tais açúcares também foram observados em meios inoculados com outros fungos. Estes autores postularam que a ação da invertase e da frutossiltransferase,

na sacarose, poderia ser primeiramente devido à necessidade de glicose para o crescimento do *Fusarium oxysporum*, e que a síntese de glucofrutosanas poderia ser somente uma outra via da reação, que seria utilizada como fonte de energia, quando o suprimento de sacarose do meio fosse inadequado. Com base nesses dados os autores concluíram que a frutossiltransferase e a invertase eram enzimas diferentes, e que glucofrutosanas são sintetizadas, principalmente, pela ação da frutossiltransferase.

As características da produção de frutooligossacarídeos através da transfrutossililação enzimática da β -frutofuranosidase são muito similares para *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans*. A enzima catalisa a transferência de um resíduo frutossil para um acceptor que tenha 2- β -D frutofuranose, tais como: sacarose, 1-kestose ou nistose. Os principais oligossacarídeos produzidos são 1-kestose e nistose. A β -frutofuranosidase de *Arthrobacter sp* K-1 catalisou a hidrólise e transferência da sacarose para produzir 1-kestose como principal produto de transfrutossililação (FUJITA *et alii*, 1990a). Ao contrário da sacarose, 1-kestose e nistose não foram aceptores efetivos para resíduos frutossila da enzima de *Arthrobacter sp* K-1. As β -frutofuranosidasas de *Aspergillus awamori* e *Penicillium oxalicum* produziram dois tipos de trissacarídeos: 1-kestose e neokestose. Isto demonstra que diferentes enzimas apresentam especificidades relativas diferentes para os grupos aceptores (OH-1^{F} , OH-6^{F} e OH-6^{G}) da sacarose, produzindo 1-kestose, 6-kestose e neokestose, respectivamente. Além disso, a água e substratos competem para serem aceptores do resíduo frutossila no sistema de reação. A produção de frutooligossacarídeos aumenta quando a concentração de sacarose se eleva (STRAATHOF *et alii*, 1986; HIRAYAMA *et alii*, 1989; FUJITA *et alii*, 1990a; DUAN *et alii*, 1993).

Apesar da reação de transfrutossililação ocorrer em vários microrganismos, esta atividade de transferência é quantitativamente diferente entre as diferentes linhagens microbianas. Em geral, as β -frutofuranosidasas possuem as atividades de transfrutossililação (U_{t}) e de hidrólise (U_{h}). A relação entre $U_{\text{t}}/U_{\text{h}}$ indica a capacidade de transfrutossililação de cada linhagem. Para a produção eficiente de frutooligossacarídeos deve haver uma alta proporção de $U_{\text{t}}/U_{\text{h}}$ e alta atividade enzimática. A transfrutossililação é maior com o aumento na concentração de sacarose, havendo uma competição entre a água e outros

substratos pela transferência de radicais frutossil nas reações catalisadas pelas β -frutofuranosidasas (HIDAKA *et alii*, 1988; HIRAYAMA *et alii*, 1989; CHANG *et alii*, 1994). A atividade desta enzima é fortemente inibida pela glicose que é gerada como subproduto, conseqüentemente, nem todas as moléculas de sacarose são convertidas em frutooligossacarídeos pela β -frutofuranosidase. A maioria dos frutooligossacarídeos produzidos industrialmente a partir da sacarose contém, no máximo, 55-60% de frutooligossacarídeos, e o restante por sacarose, glicose e frutose.

2.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE β -FRUTOFURANOSIDASE

Os frutooligossacarídeos (GF₂, GF₃ e GF₄), são produzidos a partir da sacarose através da ação das β -frutofuranosidasas microbianas obtidas de *Arthrobacter sp* (FUJITA *et alii*, 1990a,b), *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et alii*, 1992b,c; DUAN *et alii*, 1993; CHEN, 1996), *Aspergillus niger* (HIDAKA *et alii*, 1988; PARK & ALMEIDA, 1991), *Aspergillus oryzae* (PAZUR, 1952; CHANG *et alii*, 1994), *Aspergillus sydowi* (MURAMATSU *et alii*, 1988), *Aureobasidium pullulans* (JUNG *et alii*, 1987; HAYASHI *et alii*, 1989 e LEE *et alii*, 1992), *Candida sp.* (PARK *et alii*, 1993), *Candida krusei* (EDELMAN, 1954), *Claviceps purpurea* (DICKERSON, 1972), *Fusarium oxysporum* (GUPTA & BHATIA, 1980; NISHIZAWA *et alii*, 1980), *Penicillium frequentans* (USAMI *et alii*, 1991), *Penicillium oxalicum* (YASUDA *et alii*, 1986), *Penicillium spinulosum* (BEALING, 1953), *Phytophthora parasitica* (HANKIN & McINTYRE, 1977), *Streptococcus mutans* (WENHAM *et alii*, 1979).

As β -frutofuranosidasas de fungos, especificamente, *Penicillium oxalicum* (YASUDA *et alii*, 1986), *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIDAKA *et alii*, 1988), *Aspergillus sydowi* (MURAMATSU *et alii*, 1988), *Aureobasidium sp* 20524 (HAYASHI *et alii*, 1991c), *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992b,c e 1993) e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994) apresentaram alta atividade de transfrutossilação.

Entretanto, as características bioquímicas da enzima β -frutofuranosidase, como temperatura e pH ótimo de atividade, temperatura e pH de estabilidade, peso molecular, efeito de íons metálicos e efeito de inibidores químicos na atividade, variam em função da linhagem microbiana. UHM *et alii* (1987) constataram que três subunidades da β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* M-79 eram glicoproteínas com teores de 33, 40 e 20% de carboidratos, respectivamente. HIDAOKA *et alii* (1988) e HIRAYAMA *et alii* (1989) demonstraram que β -frutofuranosidasas de diferentes linhagens microbianas revelaram especificidades relativas diferentes para os três receptores alcoólicos primários da sacarose (OH-1^F, OH-6^F e OH-6^G).

A β -frutofuranosidase intracelular purificada de *Aspergillus niger* ATCC 20611 foi estudada por HIRAYAMA *et alii* (1989), sendo constatado que seu peso molecular determinado por filtração em gel Sephadex G-200 foi de 340.000 Daltons (Da). Entretanto, por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, a enzima apresentou uma única banda, cujo peso molecular foi estimado em 100.000 Da; tal diferença sugere a presença de subunidades na sua estrutura. A β -frutofuranosidase apresentou atividade ótima em pH 5,0-6,0 e a 50-60 °C, mostrou-se estável em pH de 4,5 a 10,0, após 30 minutos de incubação a 40 °C, mantendo-se com 81% de sua atividade em temperaturas inferiores a 50 °C, após 30 minutos de reação. No estudo da influência dos íons metálicos (Mg²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Ag⁺, Cu²⁺) e das substâncias químicas (ρ -cloromercuribenzoato, anilina e EDTA) na atividade enzimática foi verificado que somente o íon mercúrio na concentração de 1mM inativou a enzima, e os demais não afetaram a atividade. PARK & ALMEIDA (1991) observaram que a transfrutossilase extracelular de *Aspergillus niger* apresentou pH ótimo de atividade e estabilidade na faixa de 5,5 a 6,0, sendo a temperatura ótima de atividade 55 °C.

Para a espécie de *Aspergillus japonicus*, HAYASHI *et alii* (1992b) também relataram que a β -frutofuranosidase bruta de *Aspergillus japonicus* MU-2 apresentou pH e temperatura ótima de atividade entre 5,0 e 5,5 e 60 e 65 °C, respectivamente. A enzima manteve-se estável na faixa de pH 4,0 a 9,0, retendo 90% de sua atividade, após incubação de 15 minutos. Em temperaturas inferiores a 50 °C e 15 minutos de incubação, a β -frutofuranosidase manteve-se estável, retendo 86% da atividade a 60 °C, sendo, porém, completamente inativada a 70 °C.

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

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

Em relação à cultura de *Aspergillus oryzae*, em 1952 PAZUR isolou uma linhagem que produzia uma enzima de transferência de carboidratos: transfrutoseidase. A ação dessa enzima diferia daquela transfrutoseidase de extrato de alcachofra caracterizada por EDELMAN & BACON (1951). A principal diferença era quanto à especificidade do substrato. Sacarose e rafinose atuavam como substratos para a enzima do *A. oryzae*, mas, não para a enzima da alcachofra. Por outro lado, a inulina atuava como substrato para a transfrutoseidase de alcachofra, mas, não para a de *A. oryzae*. Diferenças menores existiram em relação ao requerimento de co-substratos para as duas enzimas, como por exemplo: melezitose para transfrutoseidase de alcachofra e inulobiosil-D-glucose para transfrutoseidase de *A. oryzae*. O modo de ação da transfrutoseidase foi representada por duas etapas: na primeira, o mecanismo envolvia a colisão da enzima com as moléculas de substrato, formando um complexo frutoseil-enzima (FR.E.), relativamente estável com liberação tanto de glicose quanto de melibiose. A segunda etapa envolvia a aproximação do complexo frutoseil-enzima com a molécula do co-substrato e a transferência de unidades de frutose ao co-substrato com a dissociação de novos oligossacarídeos do complexo. Portanto, o mecanismo de ação da transfrutoseidase consistia na transferência de unidades frutoseil, da sacarose ou rafinose, para compostos frutoseil, como frutose, sacarose, 1-inulobiosil-D-glucose ou rafinose. Estes compostos frutoseil atuavam como co-substratos para a enzima.

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

Com relação a linhagem de *Aureobasidium sp* ATCC 20524, as frações P-1 e P-2 da β -frutofuranosidase intracelular purificada foram estudadas quanto às suas características enzimáticas, em diversos trabalhos por HAYASHI *et alii* (1991a, 1992a, 1992c, 1992e, 1994a). As frações P-1 e P-2 apresentaram peso molecular de 318.000 e

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

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

HAYASHI *et alii* (1992d,f) estudaram o efeito da deglicosilação nas propriedades da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp ATCC 20524. A remoção do carboidrato da enzima foi realizada pela endo- β -N-acetilglucosaminidase F, com redução no teor de carboidrato de 53% (p/p) para 15% (p/p). A estabilidade da β -frutofuranosidase deglicosilada em pH 4 a 7 e na temperatura de 40 a 50 °C foi diminuída, e o valor de K_m

para a sacarose foi aumentado de 0,65 para 1,43 M. Os autores concluíram que o carboidrato protege a enzima da proteólise, além de exercer um papel fundamental na estabilização das enzimas.

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

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

JUNG *et alii* (1989) e HAYASHI *et alii* (1990) constataram que a frutossiltransferase extracelular bruta de *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245 e a β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 apresentaram, respectivamente, atividade ótima a 55 °C em pH 5,5 e a 50 °C em pH 5-6. Quanto ao pH e

temperatura de estabilidade, a β -frutofuranosidase intracelular bruta de *Aureobasidium sp* ATCC 20524 manteve-se estável em pH 5 a 6, retendo 90% de sua atividade após 3 horas de incubação, e com retenção de 95% em sua atividade ótima em temperaturas inferiores a 50 °C.

Uma nova linhagem de *Aureobasidium sp* 771-1 produtora de β -frutofuranosidase foi isolada por OLIVEIRA (1997). A enzima purificada apresentou pH e temperatura ótima de 5,5 e 55 °C, respectivamente, mostrando-se estável na faixa de pH 4,5 a 6,0 em temperaturas inferiores a 55 °C, sendo inibida pelo íon Hg^+ e I_2 e, também, pelos reagentes bromosuccinimida e p-hidroximercuribenzoato, nas concentrações de 1 e 10 mM, após 30 minutos de incubação a 55 °C. Quanto aos parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, a β -frutofuranosidase apresentou os valores de 0,36 M e 6,3 $\mu\text{mol/ml/min}$, respectivamente, para o substrato sacarose. Seu peso molecular foi estimado em 200.000 Da, através de filtração em gel Sephadex G-200. A enzima converteu 61% da sacarose (50% p/v) para frutooligossacarídeos, sendo obtidos 38% de 1-kestose, 20% de nistose e 3% de frutofuranosil nistose.

FUJITA *et alii* (1990b) relataram que a β -frutofuranosidase extracelular purificada de *Arthrobacter sp* K-1 apresentou peso molecular de 52.000 e 51.000, determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e filtração em Ultragel AcA 44, respectivamente. O pH e a temperatura ótima de atividade foram de 6,5-6,8 e 55 °C, respectivamente. A enzima mostrou-se estável, após 2 horas de incubação, na faixa de pH 5,5 a 10,0 a 40 °C. A β -frutofuranosidase apresentou estabilidade térmica, após 30 minutos de incubação, em temperaturas inferiores a 45 °C, a pH 6,5, e manteve cerca de 72% de sua atividade original após incubação a 60 °C. Quanto ao efeito de íons metálicos e outros reagentes na atividade da β -frutofuranosidase, em concentrações de 1 mM, os referidos autores observaram que a enzima foi quase completamente inativada pelos íons Cu^{2+} , Ag^+ , e Hg^{2+} , cujas atividades relativas foram de 1,1%, 0,9% e 0,5%, respectivamente. Os íons Zn^{2+} , Sn^{2+} e Pb^{2+} , também inibiram consideravelmente a β -frutofuranosidase, onde as atividades relativas foram 18,3%, 22,2% e 33,9%, respectivamente.

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

Segundo HIRAYAMA *et alii* (1989), a β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger* ATCC 20611 é uma glicoproteína que contém cerca de 20% (p/p) de carboidratos. As β -frutofuranosidasas de *Arthrobacter sp* K-1, *Aureobasidium sp* ATCC 20524 e *Aspergillus japonicus* MU-2 apresentaram teores de 2,4%, 20% e 30-53 % de glicose, respectivamente (FUJITA *et alii*, 1990b; HAYASHI *et alii*, 1991c; HAYASHI *et alii*, 1992c).

NISHIZAWA *et alii* (1980) ao caracterizarem parcialmente a β -frutofuranosidase de *Fusarium oxysporum*, verificaram que havia duas isoenzimas denominadas P-1 e P-2, que correspondiam, respectivamente, às enzimas obtidas do meio de cultura na fase micelial (estágio inicial de crescimento) e na fase conidial (estágio final de crescimento), cujos pesos moleculares variaram em função do tipo da metodologia empregada e da temperatura utilizada durante a sua determinação. Assim, os pesos moleculares das frações P-1 e P-2 que foram estimados a 4°C foram de 295.000 e 266.000 Da, respectivamente, por filtração em gel Sephadex G-200. Já a 25 °C, os pesos

moleculares de P-1 e P-2 foram 224.000 e 158.000 Da, respectivamente, também por filtração em gel Sephadex G-200, indicando que as enzimas apresentavam subunidades estruturais e que a associação e dissociação dessas subunidades eram dependentes da temperatura. A enzima P-2 ao ser submetida à filtração em gel de Sepharose 4B-Guanidina-HCl, à temperatura ambiente, revelou uma única proteína com peso molecular de 63.000 Da, sugerindo que P-2 seja um dímero de 63.000 Da a 25 °C e a 4 °C passaria a ser um tetrâmero. Os pesos moleculares de P-1 e P-2, determinados através da eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foram, respectivamente, 108.000 e 84.000 Da, com uma única banda para ambas as enzimas. Quando as enzimas foram submetidas a ligações cruzadas com dimetilsuberimidato (DMS), e, posteriormente, sujeitas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, a isoenzima P-1 apresentou três bandas de proteína e P-2, duas bandas, demonstrando que cada enzima tinha uma subunidade estrutural, composta presumivelmente de subunidades idênticas. Os pesos moleculares de P-1 e P-2, determinados através de ultracentrifugação foram, respectivamente, 202.000 e 140.000 Da. As isoenzimas P-1 e P-2 apresentaram K_m de 4,4 mM e 2,1 mM, respectivamente, utilizando sacarose como substrato.

2.5. PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

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

A sacarose, sendo um substrato de baixo custo, principalmente no Brasil, vem sendo utilizada como doadora de frutose na síntese de frutooligossacarídeos de cadeia curta, comumente referidos como “neosugar” (HIDAKA *et alii*, 1986; HIDAKA *et alii*, 1988). Estes açúcares são produzidos comercialmente pela Meiji Seika Kaisha Ltda do Japão, que utiliza a β -frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) derivada do *Aspergillus niger*, e estão disponíveis tanto na forma bruta, com 55% de neosugar, quanto na forma

purificada, com 100% de neosugar (HIDAKA *et alii*, 1988). Como a forma purificada é obtida através de separação em colunas cromatográficas de troca iônica, métodos mais econômicos de produção de frutooligossacarídeos com alto teor de kestose e nistose vêm sendo pesquisados, entre eles a utilização das enzimas glicose oxidase e glicose isomerase para reduzir ou eliminar o teor de glicose livre, pois em concentrações acima de 10% a glicose inibe a atividade da β -frutofuranosidase (CPC INTERNATIONAL INC. 1981; JUNG *et alii*, 1993; YUN *et alii*, 1993 e 1994a). Se direcionarmos os frutooligossacarídeos como alimentos funcionais e não como adoçante, eles podem ser comercializados na forma bruta como aditivos em alimentos.

Recentemente, BARTHOMEUF & POURRAT (1995) isolaram uma linhagem de *Penicillium rugulosum* que possuía um sistema enzimático misto constituído de frutossiltransferase e uma glicosidase que produziram altos teores de frutooligossacarídeos a partir da sacarose. Em 10 horas de fermentação foram produzidos 53,15% de nistose, 22,80% de frutofuranosil nistose e 7,87% de 1-kestose, a partir de solução de sacarose a 65%. HANG *et alii* (1995) também selecionaram uma outra linhagem, *Aspergillus foetidus*, que cultivada em meio semi-sólido de resíduo de maçã era capaz de converter sacarose em um xarope de frutooligossacarídeos contendo mais de 50% de kestose. Segundo YUN *et alii* (1990 e 1992a), a produtividade máxima de frutooligossacarídeos foi atingida com β -frutofuranosidase de *Aureobasidium pullulans*, utilizando-se concentrações de 770 a 850 g/litro de sacarose. CHANG *et alii* (1994), FUJITA *et alii* (1990a) e HIRAYAMA *et alii* (1989) obtiveram alta capacidade de transfrutossilacção em concentrações de 50% de sacarose com β -frutofuranosidasas de *Aspergillus oryzae*, *Arthrobacter* sp. K-1 e *Aspergillus niger*, respectivamente.

Frutooligossacarídeos com vários graus de polimerização estão sendo produzidos através da hidrólise parcial da inulina da chicória pela Warcoing S.A e Raffinerie Tirlemontoise S.A. da Bélgica, sob os nomes comerciais de fibruline e raftilose (L60, L85, L95 e P95), respectivamente. A Suiker Unie, da Holanda, iniciou também a produção de fibruline (FUCHS, 1991). MANLEY-HARRIS & RICHARDS (1991), relataram a termólise a 100 °C da sacarose amorfa através da ação de um catalisador ácido (ácido cítrico), com a formação de três kestoses e seus α -frutofuranosil anômeros.

Comparando a obtenção de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, via enzimas microbianas, com os de origem vegetal, como os de chicória, os obtidos por sacarose apresentam vários fatores a seu favor, como a sua produção poder crescer expressivamente ano a ano devido a facilidade de se encontrar o substrato, a metodologia empregada ser relativamente simples, os frutooligossacarídeos (GF₂, GF₃ e GF₄) não são hidrolisado pelas enzimas do intestino humano, e são considerados como fatores bifidogênicos, ou seja, são alimentos funcionais (LEE *et alii*, 1992; YUN *et alii*, 1994a).

A produção de frutooligossacarídeos utilizando-se β -frutofuranosidase fúngica apresenta o problema de inibição da enzima pela glicose gerada como subproduto (JUNG *et alii*, 1989 e 1993), interrompendo a reação enzimática e deixando cerca de 10% de sacarose sem ser convertida. Portanto, o teor máximo em base seca de frutooligossacarídeos nos produtos comerciais é de 55 a 60% (YUN *et alii*, 1990). Há dificuldade em atender ao aumento na demanda por frutooligossacarídeos devido aos processos utilizados na sua produção, ou seja: o sistema em batelada com enzima solúvel apresenta baixa produtividade, enquanto o sistema contínuo com enzimas imobilizadas possui baixa operacionalidade, resultado de uma restrição difusional na matriz do gel, além dos aspectos de preparação e descarte após inativação (YUN *et alii*, 1995). Refletindo esta situação, deve-se salientar que a produtividade é obviamente o fator crítico para produção comercial de frutooligossacarídeos. Para superar este problema, vários pesquisadores têm tentado imobilizar a frutotransferase solúvel em diversos suportes, tais como: vidro poroso (HAYASHI *et alii*, 1991a,b); sílica (HAYASHI *et alii*, 1992a, 1993); DEAE-celulose (HAYASHI *et alii*, 1994a); alginato (HAYASHI *et alii*, 1994b); trocadores iônicos de alta porosidade (YUN *et alii*, 1995). Contudo, um sistema prático que atenda às exigências industriais não foi relatado até o presente.

2.6 MUTAÇÃO EM *Aspergillus niger*

A produção de enzimas em grande escala, em nível industrial, a partir de células vegetais ou animais eucarióticas superiores é, em muitos casos, pouco viável, mesmo através de técnicas de cultura de tecido. Pela utilização das novas tecnologias,

principalmente as de genética, torna-se possível produzir essas enzimas a partir de cultivos de microrganismos, onde eles próprios já produzem a enzima ou então faz-se a inserção do gene responsável pela produção da enzima num microrganismo (AZEVEDO, 1985).

Segundo AZEVEDO, a biotecnologia pode ser entendida como a utilização de sistemas celulares para a obtenção de produtos ou para desenvolvimento de processos industriais. Entretanto, a biotecnologia é mais ampla e visa, isto sim, a otimização de seres vivos por técnicas especiais que, pelo menos teoricamente, seriam extremamente difíceis de ocorrerem naturalmente. Em outras palavras, além de utilizar os processos normais de variação e cruzamentos naturais, ela deixa essa passividade para ser ativa e busca empregar processos de manipulação genética de laboratório (AZEVEDO, 1985).

As técnicas de genética disponíveis hoje permitem modificar o patrimônio genético de um microrganismo para que ele possa ser utilizado mais eficientemente, ou ainda, para fabricar determinados produtos que não podiam ser obtidos por fermentação. Produção de enzimas, antibióticos, proteínas, aminoácidos, entre outros, servem para ilustrar as enormes potencialidades do melhoramento genético e da engenharia genética como ferramentas valiosíssimas para a indústria de fermentações (MENEZES, 1989).

A idéia de tratar microrganismos com agentes mutagênicos e ensaiar entre os sobreviventes aqueles que aumentam sua capacidade de produção de ácido cítrico foi adotado por KRESLING & STERN (1935) citado por SILVA (1997), os quais verificaram pela primeira vez que mutantes de *A. niger* obtidos por tratamentos com luz ultravioleta produziram consideravelmente mais ácido cítrico que a linhagem parental. DILLER *et alii* (1946) verificaram que o mutante (por raios X) de *A. niger* mostrou-se mais eficiente na produção de ácido cítrico que a linhagem parental, embora crescesse mais lentamente e produzisse menor quantidade de micélio. GARDNER *et alii* (1956), utilizando mutante de *A. niger* induzidos por irradiação com raios X e luz ultravioleta, também obtiveram uma maior produção de ácido cítrico e um desenvolvimento mais lento da colônia pela linhagem mutante. Entretanto, GERHARDT *et alii* (1946), utilizaram o mesmo processo de seleção e dentre vinte isolados monospóricos de *A. niger* produtores de ácido cítrico, nenhum deles apresentou aumento na produção. ILCZUK

(1968) citado por CALIL (1987), estudando as características morfológicas quanto à coloração das colônias nos mutantes de *A. niger* (luz ultravioleta), verificou que nenhuma correlação foi encontrada entre a cor dos conídeos e a habilidade para produção de ácido cítrico.

PARK & SANTI (1977), usando nitrosoguanidina como agente mutagênico, isolaram um mutante de *Aspergillus awamori* que produzia o dobro da quantidade de amiloglicosidase que a linhagem parental. IVANOVA & IROKHINA (1983) citado por CALIL (1987), usando o mutagênico nitrosoguanidina (M.N.N.G.) na seleção de mutantes desreprimidos para maltose, isolaram linhagem de *A. niger* com produção de amiloglicosidase duas vezes e meia maior que a linhagem parental.

DAS (1972) em um trabalho de revisão da literatura referente a processos utilizados para seleção de linhagens produtoras de ácido cítrico, sugeriu tratamentos combinados de mutagênicos tanto físicos como químicos. BANIK (1974) utilizou tratamentos combinados de etilenoimina e luz ultravioleta para obtenção de mutantes de *A. niger* e encontrou um mutante que apresentava aumento na produção de ácido cítrico em relação a linhagem parental. NEVALAINEN (1981), usando nitrosoguanidina e raios gama, isolou um mutante de *A. niger* com produção de três a quatro vezes maior de β -galactosidase que a linhagem parental. HAYASHIDA & FLOR (1981), utilizando os mutagênicos nitrosoguanidina e luz ultravioleta para isolar mutantes de *Aspergillus awamori* com menor produção de protease, obtiveram um mutante com baixa produção de protease entre os 110 clones testados. Também encontraram um mutante que apresentou aumento na produção de ácido cítrico em relação a linhagem parental.

Com a dificuldade de se obter antibióticos através de linhagens selvagens e a necessidade de ser produzido em grande escala, foi, logo após a II Guerra Mundial, que pela primeira vez aplicou-se intencionalmente agentes mutagênicos com a finalidade de alterar a constituição genética visando aumentar o rendimento em nível industrial. Posteriormente, com o advento de outros produtos, como aminoácidos e nucleotídeos, os quais, como os antibióticos, não podiam ser produzidos economicamente com as linhagens selvagens, outras técnicas de manipulação genética, além da indução, passaram a ser aplicadas, como a recombinação e transformação (MENEZES, 1989).

Um processo industrial para ser eficiente, deve produzir o máximo, no mínimo período de tempo e no menor espaço, e portanto, com maior economia (AZEVEDO, 1985). Por isso, os novos instrumentos de recombinação e mutação vieram dar uma amplitude extra aos sistemas biológicos. Estes instrumentos são as recentes tecnologias de aumento de variabilidade e manipulação artificial de seres vivos, que permitem a “construção” de organismos com capacidades novas ou alteradas (AZEVEDO, 1985).

A síntese da enzima é regulada normalmente por genes presentes no cromossomo. Este material genético é constituído quimicamente pelo ácido desoxirribonucléico (DNA), que é uma molécula relativamente estável e apresenta uma replicação bastante fiel, sujeita a pequenas alterações que ocorrem espontaneamente durante o crescimento da cultura. Estas alterações, denominadas de mutações, podem ser benéficas do ponto de vista biotecnológico, mas ocorrem numa frequência muito baixa (1 em 10^6 a 10^{10} células por geração) (GRAEL & MENEZES, 1989).

Para aumentar a frequência de mutações utilizam-se diversos agentes que vão induzir alterações no material genético como, por exemplo: agentes físicos como as radiações ionizantes (raios X) e não ionizantes (luz ultravioleta); agentes químicos (N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina, ácido nitroso, hidroxilamina), inserção e deleção de fragmentos de DNA (GRAEL & MENEZES, 1989; HENRIQUES & QUEROL, 1987).

A radiação ultravioleta é absorvida por diversas substâncias celulares, mas de modo mais significativo pelos ácidos nucleicos, induzindo à formação de dímeros de piridina e hidratos de pirimidina. Estes hidratos formados possibilitam um pareamento alterado sendo, provavelmente, o responsável pela mutagênese (GRAEL & MENEZES, 1989). Nitrosoguanidina age preferencialmente na guanina (alquilação), acarretando um erro na replicação da fita de DNA e, conseqüentemente, tende a alterar a sequência da fita. Esta nova ordem de bases nitrogenadas, causada por UV ou M.N.N.G., pode conduzir a mudança de aminoácidos que constituem a proteína, e conseqüentemente, nas propriedades enzimáticas, podendo levar a alterações nas características biológicas do indivíduo. Sabe-se que as mutações espontâneas são raras, embora se saiba que exista a variabilidade genética dentro da espécie (GURGEL, 1985).

Os problemas principais na mutagênese são: avaliação da dose ótima, do mutagênico a ser usado e a manutenção da viabilidade deste novo material biológico. O desejável é que a mutação resulte somente em aumento da produção do metabólito desejado sem alterar as características do microrganismo, como exemplo, eliminar a atuação do repressor no processo desejado (BALL, 1985).

As tentativas de incrementar o rendimento de processos devem ser feitas em ambos sentidos: melhoramento genético e otimização das condições ambientais de produção (nutrientes, aeração, pH e temperatura) (MENEZES, 1989; DALE, 1983). Há muitas outras qualidades que não se referem simplesmente à alta produtividade enzimática e que podem auxiliar na redução dos custos do processo, como inóculo viável, taxa de crescimento alta do microrganismo, substrato de baixo custo a ser utilizado na fermentação, facilidade e simplicidade da separação do produto desejado (BALL, 1985).

Aplicação dos conhecimentos de fisiologia de microrganismo aos trabalhos de otimização das condições ambientais de produção permitem que se obtenha produtividade máxima, conforme o patrimônio genético da linhagem utilizada, mas somente alterando este patrimônio pode-se esperar rendimentos mais elevados (MENEZES, 1989).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DE MUTANTES PRODUTORES DE β -FRUTO-FURANOSIDASE

3.1.1. MUTAÇÃO COM N-METIL N'-NITRO N-NITROSO-GUANIDINA (M.N.N.G.)

Esporos da linhagem de *A. niger* produtora de β -frutofuranosidase, isolada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos - FEA, foram inoculados em tubos de ensaio estéril contendo o meio de cultura YMA, constituído por 10 g de glicose, 5 g de peptona, 3 g de extrato de malte, 3 g de extrato de levedura, 20 g de agar e 1000ml de água, e incubados a 30°C (estufa Fanem) por 72 horas. Em seguida, água destilada estéril foi adicionada para obter uma suspensão de esporos (10^7 esporos/ml). Vinte mililitros desta suspensão de esporos foram misturados com 20 ml da solução de N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina (M.N.N.G.), na concentração de 4,0 mg/ml de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, por 10 minutos em tubo de centrífuga esterilizado e centrifugado imediatamente (centrífuga Beckman - modelo J2-21) para remover o sobrenadante. O precipitado de esporos foi lavado uma vez com água destilada estéril e transferido para 10 ml de meio mínimo, constituído por 40 g de glicose, 3 g de NaNO_3 , 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de KCl , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1000ml de água destilada, e agitado a 150 rpm (agitador New Brunswick Scientific - série 25), a 30 °C por 24 horas. Micélios foram separados em lâ de vidro estéril, e aliquotas de 0,1 ml do filtrado foram plaqueadas em batata-dextrose-agar (PDA) e incubadas a 30 °C. Cada colônia desenvolvida nas placas de Petri foi transferida para tubo de ensaio contendo PDA, e após crescimento satisfatório a 30 °C no tubo foi armazenada em geladeira.

3.1.2. SELEÇÃO DA LINHAGEM MUTANTE PRODUTORA DE β-FRUTOFURANOSIDASE

Cada linhagem mutante isolada de acordo com o ítem 3.1.1. foi inoculada em frascos de Erlenmeyer contendo 10 ml de meio sacarose, constituído por 100 g de sacarose, 5 g de extrato de levedura, 1 g de uréia e 1000 ml de água destilada. Os frascos permaneceram em um agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 72 horas. Após esse período, o meio fermentado foi centrifugado a 11.000 xg, 4 °C por 10 minutos. A atividade enzimática de β-frutofuranosidase no sobrenadante do meio de cultura foi determinada como descrito no ítem 3.1.2.1. e os frutooligossacarídeos foram estimados como descrito no ítem 3.1.2.2., através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A linhagem mutante que apresentou maior atividade de β-frutofuranosidase foi selecionada, e com intuito de certificar que a mutação era permanente, ou seja, era estável, a linhagem selecionada foi submetida a 10 crescimentos consecutivos em meio sacarose líquido e em cada crescimento foi determinada a atividade de β-Frutofuranosidase extracelular pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1.

Após certificar a eficácia da mutação, a linhagem mutante selecionada foi utilizada para dar andamento no trabalho. As demais foram descartadas.

3.1.2.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA β-FRUTO- FURANOSIDASE PELO TESTE DE GLICOSE OXIDASE

A atividade enzimática foi determinada através da quantificação de glicose na mistura de reação pelo teste de glicose oxidase.

Para determinação da atividade enzimática da β-frutofuranosidase, adicionou-se em um tubo de ensaio com rosca 0,9 ml da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Após equilibrado na temperatura de 55 °C, adicionou-se no tubo de ensaio com rosca 0,1 ml da solução enzimática contendo a β-frutofuranosidase. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados em banho de água

termostatizado na temperatura de 55 °C por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase. Em todos os ensaios deste experimento, o valor obtido foi subtraído do seu respectivo tubo branco de reação, e convertido em μmol de glicose/minuto/ml.

Tubo branco de reação: foi preparado um segundo tubo para cada amostra, contendo 0,9 ml do substrato sacarose e 0,1 ml da enzima que imediatamente foi incubado no banho com água em ebulição, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo.

A concentração de glicose foi determinada pelo teste de glicose-oxidase/peroxidase (Kit CELM): adicionou-se 20 μl da reação enzimática em 2,0 ml da solução reativa, incubou-se por 10 minutos a 37 °C. Os tubos foram resfriados a 15-20 °C. Em seguida, a absorbância foi medida a 525 nm (espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70).

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

3.1.2.2. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE AÇÚCARES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise quantitativa dos açúcares glicose, frutose, sacarose, GF₂, GF₃ e GF₄ foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com HIDAKA *et alii* (1988) e JUNG *et alii* (1989), em cromatógrafo CG 480 C, acoplado a um detector refratométrico diferencial IR-CG-410 e coluna YMC poliamina II, nas seguintes condições: fluxo de 1 ml/mín; pressão de 50 kg/cm², temperatura de 35 °C na coluna e no detector, acetonitrila/água como eluente na proporção de 75:25 de v/v, respectivamente, e tendo-se como padrões: frutose, glicose, sacarose, 1-kestose, nistose,

β -frutofuranosil nistose. Amostras e padrões antes de serem injetados no cromatógrafo, foram filtrados em membrana éster de celulose, com porosidade de 0,45 μm .

A atividade de β -frutofuranosidase por CLAE foi determinada através da quantificação de glicose na mistura de reação. Uma unidade de atividade de transferência da β -frutofuranosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de glicose/minuto/ml (HIDAKA *et alli*, 1988; JUNG *et alii*, 1989).

3.1.3. MUTAÇÃO POR RAIOS ULTRAVIOLETA (UV)

Para o tratamento com irradiação ultravioleta, preparou-se suspensão de esporos da linhagem mutante selecionada no item 3.1.2., e alíquotas de 5 ml foram transferidas para placas de Petri vazias previamente esterilizadas. As placas de Petri foram expostas a luz ultravioleta (aparelho UVP - model UVGL-58, $\lambda = 254$ nm, 18 Watts) a uma distância de 16 cm. As placas foram retiradas em intervalos de 3 minutos, até 15 minutos, e alíquotas de 0,1 ml de cada amostragem foram espalhadas com alça de Drigalski no meio mínimo, conforme descrito no item 3.1.1., acrescido de agar 2%. Após 48 horas de incubação a 30 °C, as colônias isoladas nas placas de Petri foram transferidas para tubos de ensaio contendo PDA e após desenvolvidas, foram armazenadas em geladeira. Quando a porcentagem de sobreviventes da amostragem foi superior a 0,1%, todas as colônias da amostragem foram descartadas.

Cada linhagem mutante isolada foi analisada quantitativamente quanto a atividade de β -frutofuranosidase através do teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e por CLAE para a linhagem que apresentou maior atividade enzimática β -frutofuranosidase, conforme descrito no item 3.1.2.2. Para certificar a estabilidade das mutações, as linhagens n° 12 e 15 foram inoculadas em meio de sacarose por 10 vezes consecutivas, e em cada crescimento a atividade de β -Frutofuranosidase foi monitorada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1. Dentre estas duas linhagens mutantes, a que apresentou maior atividade enzimática de transferência e que manteve-se estável quanto a produção de enzima, foi escolhida para dar andamento no trabalho. As demais foram descartadas.

3.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASES PELAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A.niger*

3.2.1. SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASES PELAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A.niger*

A linhagem mutante selecionada no item 3.1.3. e a parental foram inoculadas em 3 diferentes meios de cultura propícios para produção de β -frutofuranosidase, conforme indicado na literatura. Os meios selecionados foram: a) meio 1 constituído por 100 g de sacarose, 5 g de extrato de levedura, 1 g de uréia e 1000 ml de água, utilizado pelo laboratório de Bioquímica de Alimentos (FEA) para microrganismos osmofílicos; b) meio 2 constituído por 50 g de sacarose, 10 g de peptona, 10 g de extrato de levedura, 3 g de NaCl e 1000 ml de água, utilizado por PARK & ALMEIDA (1991) para espécie *A. niger* produtora de β -Frutofuranosidase; c) meio 3 constituído por 50 g de sacarose, 10 g de peptona, 10 g de extrato de malte, 3 g de NaCl e 1000 ml de água, utilizado por HAYASHI *et alii* (1989) para a espécie de *Aureobasidium* produtora de β -Frutofuranosidase.

Alíquota de 1 ml da suspensão de esporos das linhagens mutante e parental foi inoculada em frascos de Erlenmeyer contendo 10 ml de meio 1, 2 ou 3. Os frascos permaneceram em um agitador rotatório a 200 rpm, 30 °C, por 72 horas. Após esse período, o meio fermentado foi centrifugado a 11.000 xg, 4 °C por 10 minutos. A atividade enzimática de β -frutofuranosidase no sobrenadante do meio de cultura foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1.

3.2.2. ESTUDO DA RELAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A.niger*

Uma alíquota de 120 ml da suspensão contendo 10^7 /ml de esporos de *A. niger* foi adicionada no fermentador (New Brunswick Scientific - modelo Bioflo II) contendo 800 ml de meio 2, conforme descrito no ítem 3.2.1. O desenvolvimento do fungo foi realizado a 28 °C, sob agitação de 200 rpm e aeração de 1,5 litros/minuto.

Em intervalos de tempo, durante um período de 92 horas, foram retiradas amostras do meio fermentado para determinação do pH e atividade da β -frutofuranosidase extracelular. A atividade da β -frutofuranosidase no sobrenadante do meio de cultura foi determinada de acordo com o ítem 3.1.2.1.

3.3. PRODUÇÃO DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS A PARTIR DE LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Alíquotas de 1,5 ml da suspensão celular de cada linhagem, mutante e parental, foram inoculadas em 20 frascos de Erlenmeyer (para cada linhagem) contendo 11 ml de meio 2, conforme descrito no ítem 3.2.1. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, temperatura de 30 °C por 30 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi centrifugado a 4 °C, 11.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi distribuído em frascos e congelado para o estudo das características bioquímicas da β -frutofuranosidase bruta, como descrito no ítem 3.4., e uma alíquota de 75 ml do sobrenadante foi utilizada para a purificação da enzima, conforme descrito no ítem 3.5.

3.4. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O estudo das características bioquímicas das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de *A. niger* em relação ao efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima, e ao efeito do pH e temperatura na estabilidade da enzima foram realizados com o sobrenadante obtido de acordo com o ítem 3.3.

3.4.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em um tubo de ensaio com rosca 0,9 ml de solução de sacarose em diferentes tampões, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os sistemas tampão foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato 0,1 M (pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 7,0) e TRIS 0,1 M (pH 8,0 e 9,0). Após equilibrado a temperatura de 55 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -frutofuranosidase bruta, obtida de acordo com o ítem 3.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostaticado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1., e expressas em porcentagem da atividade relativa.

3.4.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade das enzimas β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -frutofuranosidase extracelular bruta, obtida no ítem 3.3., e 0,2 ml de diferentes tampões. Os sistemas tampão foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato 0,1 M (pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 7,0) e TRIS (pH 8,0 e 9,0). Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura, foram pré-incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos, e em seguida foram resfriados em banho de gelo. Para determinar a atividade residual da enzima, adicionou-se, nos tubos de ensaio com rosca, 0,7 ml da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 a 55 °C, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1., e expressos em porcentagem de atividade relativa.

3.4.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,9 ml de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Após equilibrado nas temperaturas de: 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -fruto-furanosidase bruta, obtida de acordo com o ítem 3.3. Os tubos de

ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados em banho de água termostatizado nas respectivas temperaturas por 30 minutos. Decorrido este tempo, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa.

3.4.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS β-FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade das enzimas β-frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em um tubo de ensaio com rosca 0,1 ml da β-frutofuranosidase extracelular bruta, obtida no item 3.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a enzima, foram pré-incubados em banho de água termostatizado nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C por 30 minutos, e em seguida foram resfriados em banho de gelo.

Para determinar a atividade residual da enzima, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,9 ml da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 a 55 °C, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa .

3.5. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS β -FRUTOFURANOSIDASES EXTRACELULARES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

As preparações das β -frutofuranosidases extracelulares brutas das linhagens mutante e parental de *A. niger*, obtidas conforme item 3.3., foram purificadas parcialmente através de cromatografia em coluna de DEAE-Celulose.

3.5.1. PREPARAÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULARES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para a purificação parcial das β -frutofuranosidases extracelulares das linhagens mutante e parental de *A. niger*, uma amostra de 75 ml de sobrenadante do meio, conforme descrito no item 3.3., foi concentrada cinco vezes (ultrafiltração Amicon, modelo TCF2A) em membrana de 50.000 Da para obtenção de 15 ml de enzima concentrada. Os concentrados foram congelados em seguida.

3.5.2. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS β -FRUTOFURANOSIDASES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*, ATRAVÉS DE CROMATOGRÁFIA EM COLUNA DEAE- CELULOSE

A resina DEAE-Celulose foi ativada pelo tratamento com HCl 0,1 N por 20 minutos, lavada várias vezes com água destilada para remoção do HCl. Em seguida, adicionou-se na resina NaOH 0,1N. Após 20 minutos, lavou-se a resina várias vezes com água destilada para remoção do NaOH, e finalmente, adicionou-se na resina o tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. A resina ativada foi empacotada em colunas de 40 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro.

O concentrado enzimático, obtido de acordo com o item 3.5.1., foi aplicado à coluna de DEAE-Celulose, na proporção equivalente a 5% do volume da resina

empacotada, sendo coletadas frações com volume de 5 ml a cada 30 minutos. Durante a eluição, adicionou-se na resina tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,5 contendo NaCl nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75 e 1 M.

O curso de eluição das proteínas foi acompanhado através da medida da absorbância a 280 nm (WARBURG & CHRISTIAN, 1941), seguido da determinação da atividade da β -frutofuranosidase, de acordo com o item 3.1.2.1., nas frações que apresentarem picos de absorbância nesse comprimento de onda.

As frações contendo maior atividade enzimática foram reunidas e submetidas à diálise contra água deionizada a 7 °C durante 24 horas, e em seguida, equilibradas com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,5. A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de LOWRY *et alii* (1951) e a atividade da β -frutofuranosidase, conforme item 3.1.2.1.

3.5.3 OBTENÇÃO DAS ENZIMAS PURIFICADAS PARCIALMENTE

O eluato obtido conforme item 3.5.2. foi distribuído em vários frascos e congelado, onde posteriormente foram realizados vários estudos sobre as enzimas.

3.6. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES EXTRACELULARES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O estudo das características bioquímicas das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger* com relação ao efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima, ao efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima, ao efeito de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática, e na determinação dos parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foram realizados com o concentrado enzimático purificado parcialmente, conforme descrito no ítem 3.5.3.

3.6.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,9 ml de solução de sacarose em diferentes tampões, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os sistemas tampão foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato 0,1 M (pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 7,0) e TRIS 0,1 M (pH 8,0 e 9,0). Após equilibrado a temperatura de 55 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -frutofuranosidase purificada parcialmente, obtida de acordo com o item 3.5.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostaticado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa .

3.6.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade das enzimas β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,1 ml das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente, obtida no ítem 3.5.3., e 0,2 ml de diferentes tampões. Os sistemas tampão foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato 0,1 M (pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 7,0) e TRIS (pH 8,0 e 9,0). Os tubos de ensaio com rosca foram pré-incubados a 55 °C em banho de água termostaticado por 30 minutos, e em seguida foram resfriados em banho de gelo. Para determinar a atividade residual da enzima,

adicionou-se, nos tubos de ensaio com rosca que contém a mistura, 0,7 ml da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 a 55 °C, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressos em porcentagem de atividade relativa.

3.6.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática das β -fruto-furanosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,9 ml de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Após equilibrado nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -fruto-sfuranosidase purificada parcialmente, obtida de acordo com o item 3.5.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados em banho de água termostatizado nas respectivas temperaturas por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa.

3.6.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS β-FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade das enzimas β-frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, adicionou-se em tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β-frutofuranosidase extracelular purificada parcialmente, obtida no ítem 3.5.3. Os tubos de ensaio com rosca foram pré-incubados em banho de água termostaticado nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C por 30 minutos, e em seguida foram resfriados em banho de gelo.

Para determinar a atividade residual da enzima, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,9 ml da solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5 a 55 °C, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostaticado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa .

3.6.5 EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DAS β-FRUTO FURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Foi testado o efeito de diferentes substâncias inibidoras (arseniato, N-bromo-succinimida, p-cloromercuribenzoato, EDTA, ρ-hidroxiomercuribenzoato, iodoacetamida, e β-mercaptoetanol) e dos íons metálicos (Ag^+ ; Ca^{2+} ; Co^{2+} ; Cu^{2+} ; Fe^{2+} ; Hg^{2+} ; I_2 ; K^+ ; Mg^{2+} ; Mn^{2+} ; Zn^{2+}) na atividade enzimática das β-frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*.

Em tubos de ensaio com rosca adicionou-se: 0,5 ml da solução de íons ou de inibidores químicos nas concentrações de 1 e 10 mM, 0,4 ml de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5, sendo a concentração final de sacarose na reação igual a 10%. Após equilibrado a temperatura de 55 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -frutofuranosidase purificada parcialmente, obtida de acordo com o item 3.5.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Decorrido o tempo, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. No tubo controle só não se adicionou o inibidor ou íon. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressas em porcentagem de atividade relativa .

3.6.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: K_M E $V_{MÁX}$ DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O efeito da concentração de sacarose (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 Molar) na atividade das β -frutofuranosidasas purificadas parcialmente foi investigado.

Em tubos de ensaio com rosca adicionou-se 0,9 ml da solução de sacarose (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 M) em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5. Após equilibrado a temperatura de 55 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 0,1 ml da β -frutofuranosidase purificada parcialmente, obtida de acordo com o item 3.5.3. Os tubos de ensaio com rosca, contendo a mistura da reação, foram incubados a 55 °C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Imediatamente, os tubos de ensaio com rosca foram transferidos para um banho com água em ebulição, para interromper a reação enzimática, e após 5 minutos foram resfriados em banho de gelo. A atividade enzimática foi determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1., e expressos em porcentagem de atividade relativa .Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram determinados utilizando-se o gráfico de Augustinsson (WHITAKER, 1972).

3.7. APLICAÇÃO DA β -FRUTOFURANOSIDASE EXTRACELULAR BRUTA DA LINHAGEM MUTANTE DE *A. niger* NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A produção de frutooligossacarídeos foi testada a partir de soluções de sacarose utilizando β -frutofuranosidase bruta da linhagem mutante de *A. niger* contendo 9,02 unidades/ml de enzima, conforme descrito no item 3.5.3.

Em tubos de ensaio com rosca adicionou-se 4 ml da solução de diferentes concentrações de sacarose, em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,5, sendo a concentração final de sacarose na mistura de reação igual a 10, 30, 40 e 50 %. Após equilíbrio dos tubos na temperatura de 55 °C, adicionou-se nos tubos de ensaio com rosca 1 ml da β -frutofuranosidase. Os tubos de ensaio com rosca foram incubados a 55 °C em banho de água termostaticado, e no período de tempo zero e após 2, 6, 12 e 24 horas de reação, alíquotas de 0,5 ml foram transferidos para um outro tubo de ensaio com rosca. As alíquotas retiradas foram imediatamente incubadas em banho com água em ebulição para interromper a reação enzimática. Após 5 minutos, os tubos foram resfriados em banho de gelo. O curso da reação enzimática foi monitorado através da análise dos açúcares produzidos por CLAE, conforme descrito no item 3.1.2.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DE MUTANTES PRODUTORES β -FRUTO-FURANOSIDASE

4.1.1. MUTAÇÃO COM N-METIL N'-NITRO N-NITROSO-GUANIDINA (M.N.N.G.)

A tabela 1 ilustra a taxa de sobrevivência dos esporos da linhagem *A. niger*, produtora de β -frutofuranosidase (FFO), após tratamento com agente mutagênico N-Metil N'-Nitro N-Nitrosoguanidina (M.N.N.G.), como descrito no item 3.1.1. Observou-se o surgimento de linhagens mutantes, num total de 300 unidades formadoras de colônias (UFC), onde a taxa de sobrevivência foi de 0,003%. Todas estas novas colônias foram cultivadas isoladamente em tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura e armazenadas em geladeira.

Tabela 1: Taxa de sobrevivência de esporos quando expostos ao mutagênico M.N.N.G.

Indução a mutação por M.N.N.G.	Quantidade de esporos (ml)	Tipo de mutante	Sobreviventes (%)
Antes da exposição	10^7	-	100
Após exposição	300*	tipo M: 31* tipo P: 269*	0,003

* Unidade Formadora de Colônias (UFC)

Notou-se que após a exposição ao agente mutagênico, as UFC apresentaram duas características morfológicas distintas de colônias: a) tipo P (preta): 269 colônias com coloração negra, como a célula-mãe, típica de *Aspergillus niger*, b) tipo B (bege): 31 colônias com coloração bege, atípica de *A. niger*.

Como o objetivo deste trabalho foi selecionar um mutante de *Aspergillus niger* que produzisse β -Frutofuranosidase extracelular com alta atividade de transferência e baixa atividade hidrolítica, todas as linhagens que sobreviveram ao tratamento com M.N.N.G. , tanto tipo B como P, foram cultivadas em meio de sacarose conforme descrito no item 3.1., e os seus sobrenadantes foram analisados quanto a atividade da enzima β -frutofuranosidase pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1. As 5 linhagens que apresentaram maior atividade enzimática também tiveram as suas reações analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para confirmar a alta atividade de transferência. Dentre as selecionadas, uma linhagem do tipo B (coloração bege) se destacou como produtora de β -Frutofuranosidase extracelular com alta atividade enzimática por ambos os métodos empregados. Certificou-se que a mutação desta linhagem selecionada era estável pelo valor do coeficiente de variação da atividade enzimática durante os 10 crescimentos consecutivos ter sido em torno de 13 %. Em geral, as células de fungos são eucarióticas, sem plasmídeos, o que facilita a indução de mutantes permanentes.

Os esporos da linhagem mutante selecionada, cuja colônias apresentam coloração bege, e os da linhagem parental de *A. niger*, cuja colônias apresentam coloração preta, como demonstra as figuras 1 e 2, foram analisados morfológicamente por microscopia ótica e verificou-se que os esporos também apresentavam estrutura diferente quanto ao tamanho e número, sendo que as linhagens do tipo B possuíam menor quantidade de esporos que as do tipo P, além do seu tamanho ser bem inferior, como demonstra as figuras 3 e 4. Devido a grande quantidade de esporos produzidos pelos fungos, recobrando toda a sua superfície, a coloração da colônia de fungos é fortemente influenciada pela cor dos seus esporos, portanto, pode-se a priori justificar que a coloração bege apresentada pelas linhagens do tipo B de *Aspergillus niger* foi decorrente da diminuição do número e do tamanho dos esporos.

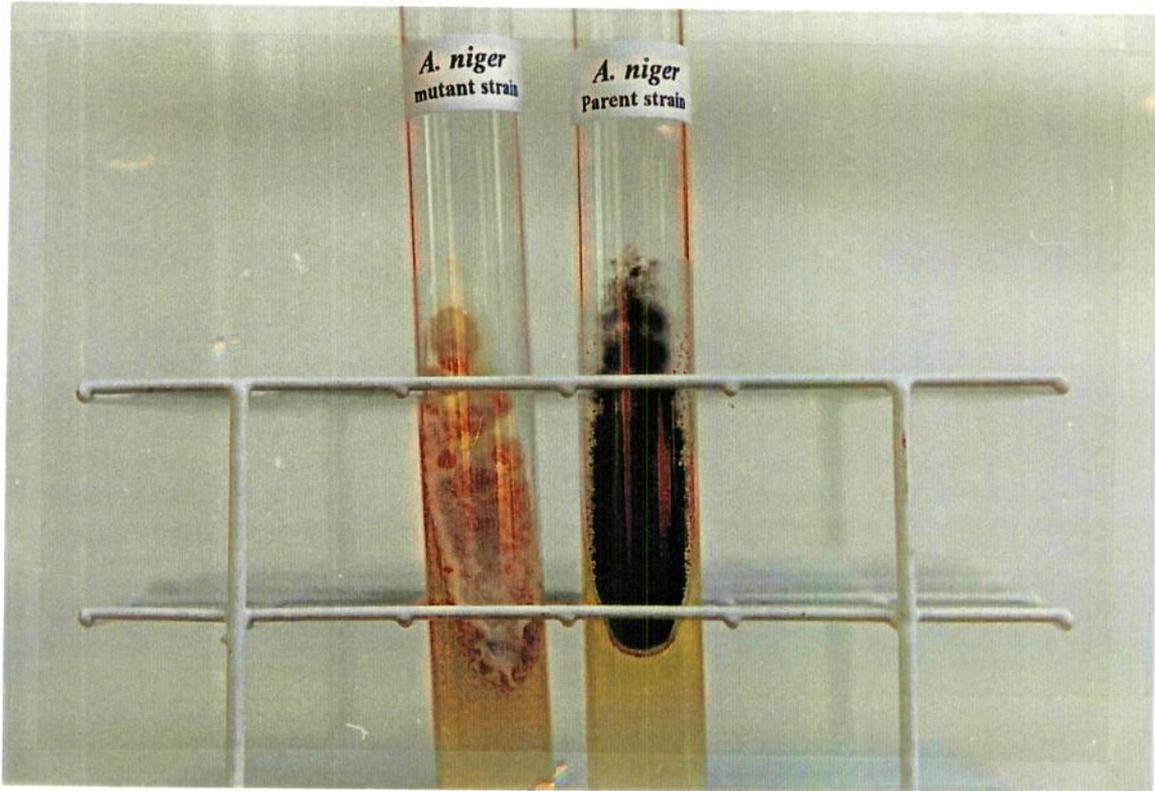


Figura 1: Cultivo das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger* em meio PDA

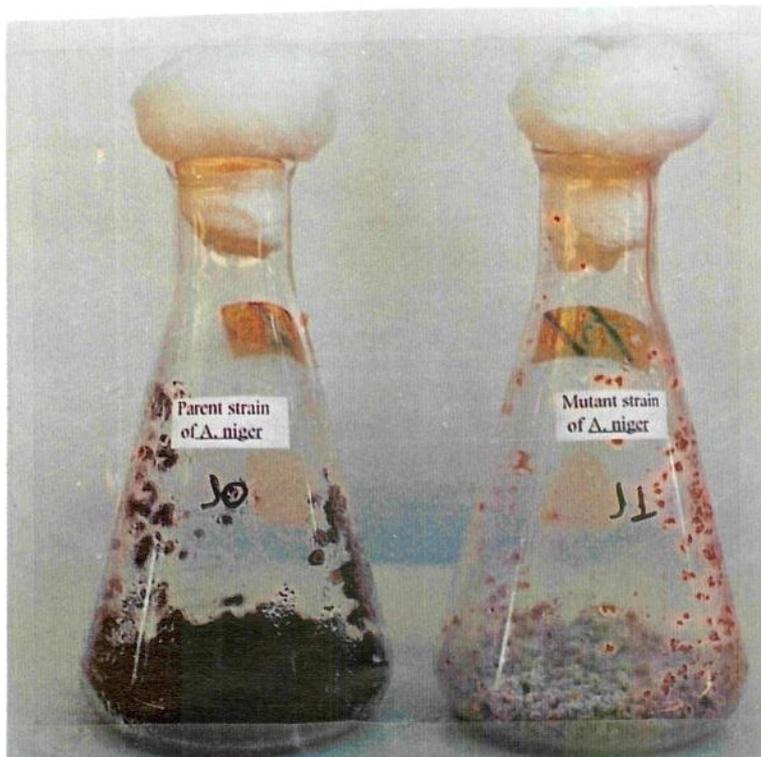


Figura 2: Cultivo das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger* em meio semi-sólido de farelo de trigo

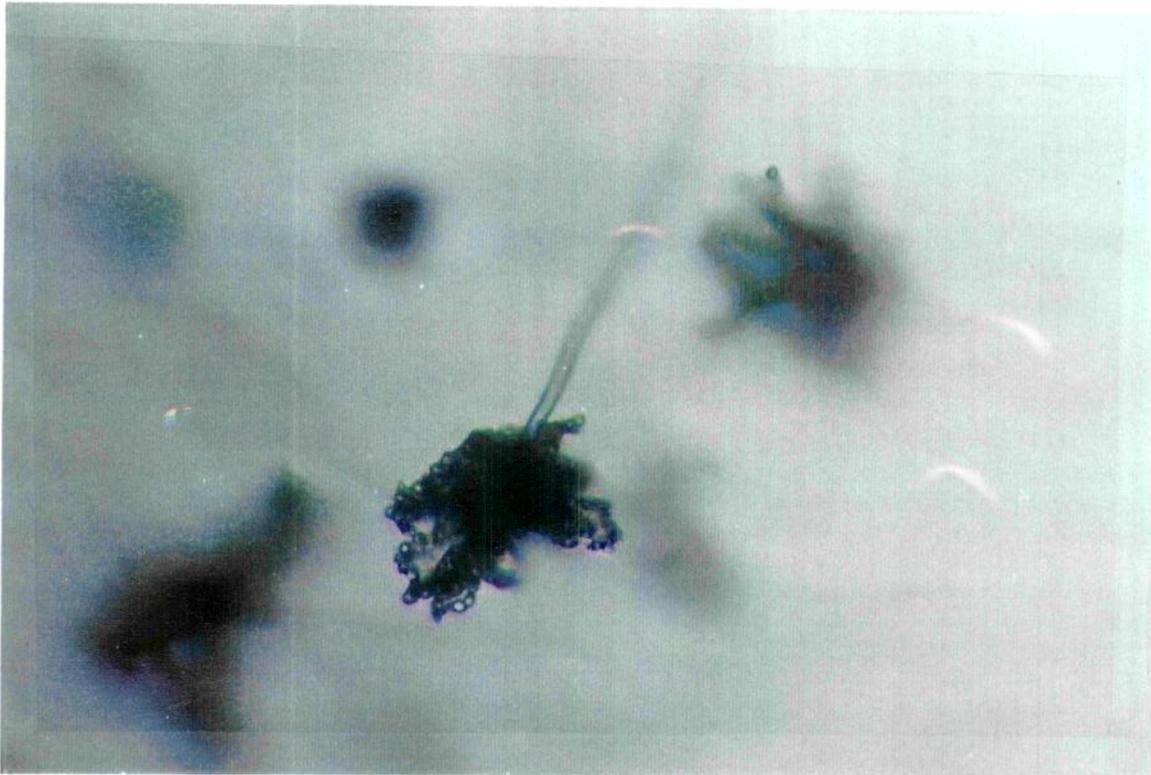


Figura 3: Características morfológicas dos esporos da linhagem mutante selecionada de *Aspergillus niger* cultivados em meio PDA (250 X)



Figura 4: Características morfológicas dos esporos da linhagem parental de *Aspergillus niger* cultivados em meio PDA (125 X)

4.1.2. MUTAÇÃO POR RAIOS ULTRAVIOLETA (UV)

A tabela 2 representa as unidades formadoras de colônias (UFC) após os esporos da linhagem mutante selecionada no ítem 4.1.1. serem submetidos aos raios ultravioleta, conforme descrito no ítem 3.1.3. Observa-se que nos tempos de exposição 12 e 15 minutos não houve sobreviventes. O tempo 3 minutos de exposição foi descartado por apresentar uma taxa de sobrevivência maior que 0,1%.

Tabela 2: Taxa de sobrevivência de esporos após irradiação com raios ultravioleta

Tempo de exposição nos raios ultravioleta (minutos)	Quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	Sobreviventes (%)
controle	30.000	100
3	130	0,434
6	25	0,084
9	12	0,040
12	0	-
15	0	-

Todas as linhagens que sobreviveram à exposição dos raios ultravioletas por 6 e 9 minutos apresentaram suas colônias com coloração bege, como o controle. Neste processo mutagênico não foi detectado visualmente nenhuma alteração morfológica nas colônias, como ocorrido no ítem 4.1.1. Estas novas colônias foram analisadas quanto a sua atividade de β -frutofuranosidase, pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1. Duas linhagens mutantes, as de número 12 e 15, se destacaram quanto a

atividade de β -frutofuranosidase, e visando a produção de frutooligossacarídeos, as atividades enzimáticas de ambas também foram analisadas por CLAE, conforme descrito no item 3.1.2.2., onde confirmaram que eram produtoras de frutooligossacarídeos.

Ambas linhagens apresentaram um coeficiente de variação menor que 10% na suas atividades enzimática, certificando assim que os mutantes são viáveis. Foi selecionada a linhagem nº 12 por apresentar maior atividade enzimática extracelular, cerca de 30%, na produção de frutooligossacarídeos de cadeia curta (GF₂, GF₃ e GF₄).

A linhagem mutante selecionada nº 12, que apresenta coloração bege, foi denominada de linhagem mutante (M) e a linhagem mãe, que não sofreu qualquer processo mutagênico, de parental (P). Quando crescidas em meio de sacarose, a linhagem mutante apresentou mais que o dobro de atividade de β -Frutofuranosidase que a parental, 9,02 e 4,37 U, respectivamente, conforme tabela 3. Ambas atividades foram determinadas pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no item 3.1.2.1.

Tabela 3: Atividades das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*.

Linhagens	Atividade de β -frutofuranosidase (μ mol glicose/min/ml)
Mutante	9,02
Parental	4,37

4.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASES PELAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

4.2.1. SELEÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE β -FRUTOFURANOSIDASES PELAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A produção de β -frutofuranosidase pelas linhagens mutante e parental de *A. niger* em diferentes meio de cultura especificamente selecionados para produção desta enzima, conforme ítem 3.3., estão representados na figura 5. Verifica-se que o meio 2, contendo sacarose 5%, peptona 1%, extrato de levedura 1% e NaCl 0,3%, apresentou uma maior atividade enzimática para ambas linhagens em comparação aos outros meios, tanto para 18 quanto para 27 horas de incubação, por isso, este foi o meio selecionado a ser usado ao longo do trabalho. Este resultado confirma o que PARK & ALMEIDA (1991) relataram sobre o efeito da fonte de carbono na produção da enzima, onde os autores verificaram uma maior atividade da β -Frutofuranosidase extracelular quando sacarose ou rafinose foi utilizada como única fonte de carbono no meio de cultura. Os autores também relataram que β -Frutofuranosidase é uma enzima induzida.

Comparando-se a produção de enzima após 18 horas e 27 horas de incubação, verificou-se que após 27 horas de incubação ocorreu, em todos os três meios testados, um aumento na atividade enzimática nas duas linhagens. Especificamente no meio selecionado nº 2, neste intervalo de tempo a atividade enzimática apresentou um aumento em torno de 4,1 vezes (de 2,81 para 11,43 U), já a linhagem parental aumentou cerca de 1,9 vezes (de 3,07 para 5,71 U).

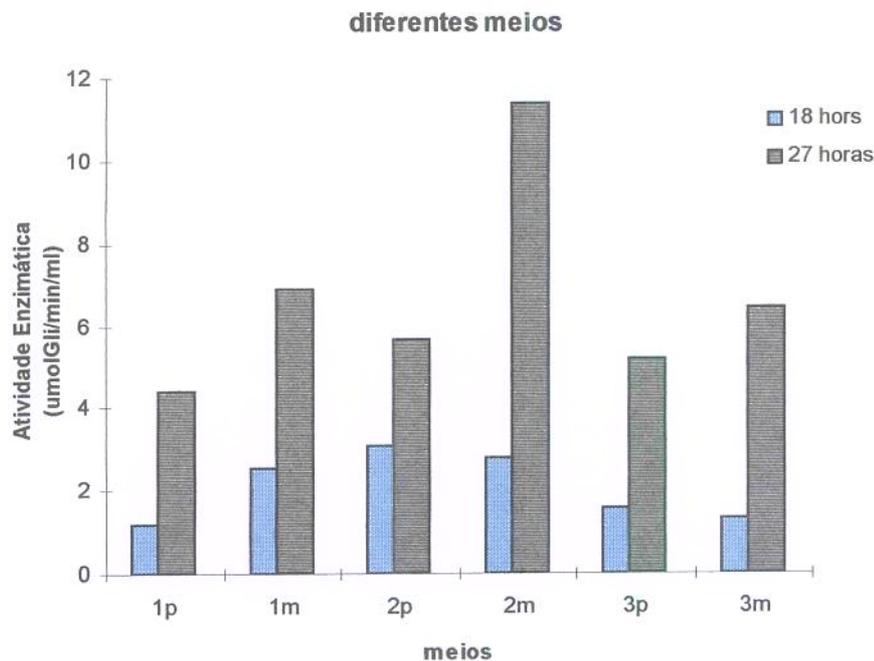


figura 5: Estudo de diferentes meios de cultura quanto à produção de β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger* em dois diferentes tempos de fermentação. No eixo X, os números correspondem aos meios de cultura (1= meio 1; 2= meio 2; e 3= meio 3) e as letras as linhagens (p= parental; m= mutante).

4.2.2. ESTUDO DA RELAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -FRUTO-FURANOSIDASES E ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O meio de cultura selecionado nº 2, descrito no ítem 3.2.1., foi utilizado no estudo da relação da produção das enzimas β -frutofuranosidases e alteração do pH do meio em função do tempo de fermentação das linhagens mutante e parental de *A. niger*. Os respectivos valores estão representados nas figuras 6 e 7 para as linhagens mutante e parental, respectivamente.

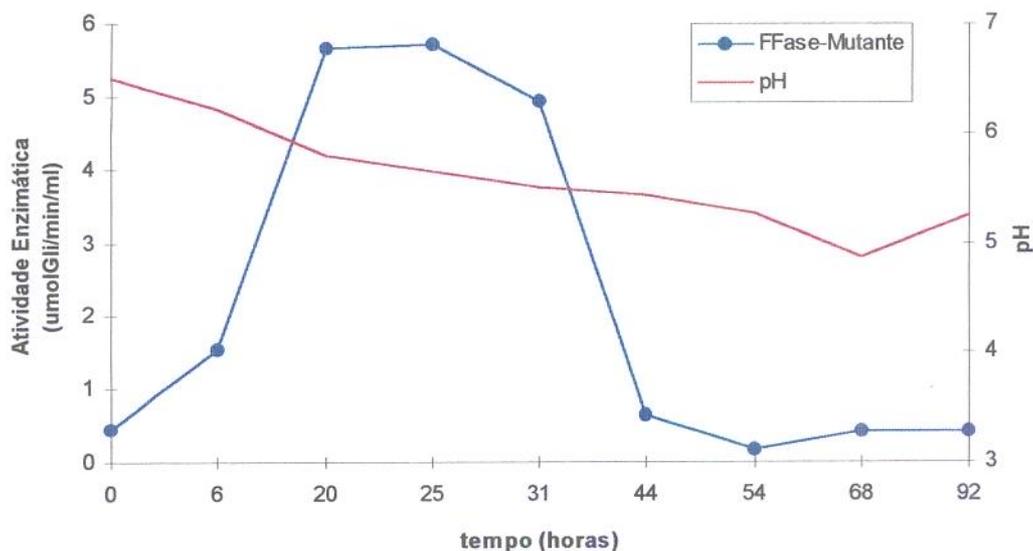


figura 6: Estudo da relação entre o tempo de fermentação, produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH da linhagem mutante de *Aspergillus niger*.

Verifica-se pela figura 6 que a atividade da β -frutofuranosidase da linhagem mutante, determinada pelo teste de glicose oxidase, conforme descrito no ítem 3.1.2.1., apresentou um aumento nas 6 primeiras horas, elevando intensamente entre 6 e 20 horas, ocorrendo um aumento moderado durante o período 20-25 horas, onde a 25 horas de fermentação apresentou a maior atividade enzimática (5,72 U), decaindo levemente no intervalo de 25-31 horas de fermentação, e fortemente de 31 a 44 horas. No intervalo de 44 a 92 horas de fermentação, a atividade enzimática permaneceu baixa.

Não foi possível obter os dados de massa celular ao longo do tempo devido a cultura das linhagens mutante e parental de *A. niger* apresentarem-se em forma de “pellets”, e estes serem bem maiores que o diâmetro interno do cano coletor de amostras do fermentador.

A figura 7 ilustra a produção de β -frutofuranosidase pela linhagem parental ao longo de 92 horas de fermentação. Nota-se que o período de produção de enzima foi similar a linhagem mutante, porém com atividade enzimática máxima sendo inferior a 50 % em relação a da mutante.

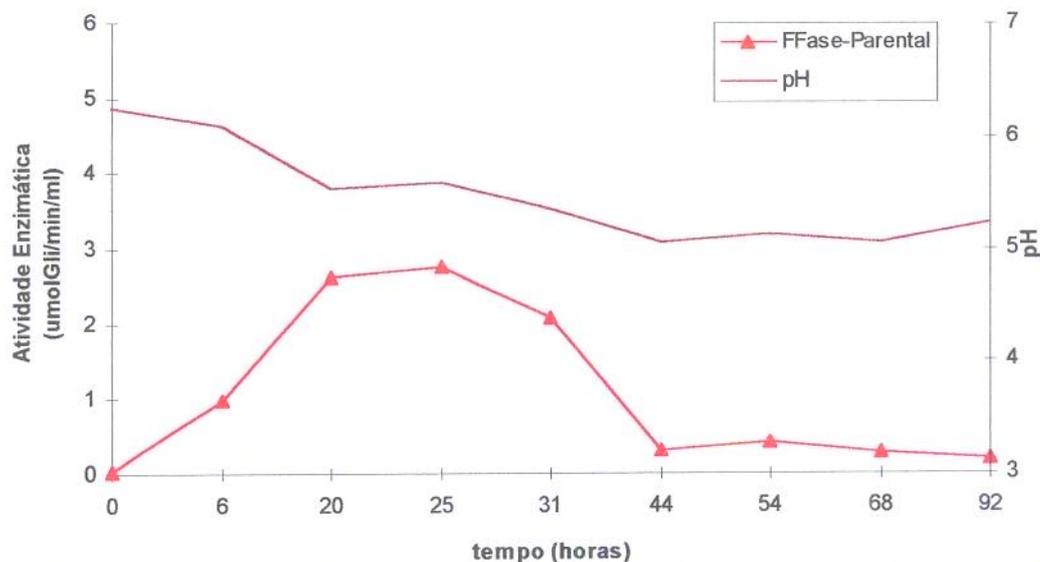


Figura 7: Estudo da relação entre o tempo de fermentação, produção de β -frutofuranosidase e alteração do pH da linhagem parental de *Aspergillus niger*.

Nota-se na figura 7 que houve um aumento nas primeiras 25 horas, sendo acentuado entre 6 e 20 horas, atingindo atividade máxima de 2,73 U a 25 horas de fermentação. Em seguida, a atividade enzimática apresentou um declínio até 44 horas, onde apresentava uma baixíssima atividade, permanecendo constante até o fim do experimento, 92 horas de fermentação.

Estes dois gráficos são típicos aos apresentados na literatura por microrganismos produtores de β -frutofuranosidase, onde a atividade enzimática inicia-se após 15 horas de fermentação, atinge o ápice entre 20 e 30 horas e em seguida começa a decair até 42 horas, e após 42 horas permanece baixa. O fato dos valores da atividade enzimática serem menores neste ensaio pode ser explicado devido as condições para o crescimento da cultura utilizando-se um fermentador com capacidade para 1,5 litros ser diferente dos frascos de Erlenmeyer de 50 ml em agitador rotatório que foram usados anteriormente, e segundo DUAN *et alii* (1994) a aeração e a agitação nos fermentadores alteram significativamente a produção da enzima β -frutofuranosidase.

4.3. PRODUÇÃO DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS A PARTIR DE LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A produção das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger* foi realizada como descrito no ítem 3.3. e foram utilizadas nos ítems 4.4., 4.5. e 4.6. O sobrenadante do meio de cultura das linhagens mutante e parental utilizados como preparação bruta de β -frutofuranosidases apresentaram respectivamente 11,4 $\mu\text{molglicose/ml/min}$ e 5,71 $\mu\text{molglicose/ml/min}$.

4.4. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

4.4.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O gráfico da figura 8 representa o efeito do pH nas atividades enzimáticas das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutante e parental de *A. niger*, expressas em % de atividade relativa, conforme descrito no ítem 3.4.1.

Nota-se que ambas enzimas tiveram comportamento semelhante em relação ao efeito do pH na atividade enzimática, sendo que a β -frutofuranosidase das linhagens mutante e parental apresentaram melhor atividade quando incubadas no pH 5,5. As duas enzimas apresentaram boa atividade relativa, acima de 80 %, na faixa de pH 5,0-6,0. Em pH inferior a 4,0 e a pH 9,0, ambas apresentaram baixíssima atividade enzimática.

Estes valores coincidem com os relatados na literatura, não só para as β -frutofuranosidases oriundas das espécies de *Aspergillus* como para as demais produtoras de frutooligossacarídeos, entre elas, enzimas brutas de *Aureobasidium pullulans* KFCC

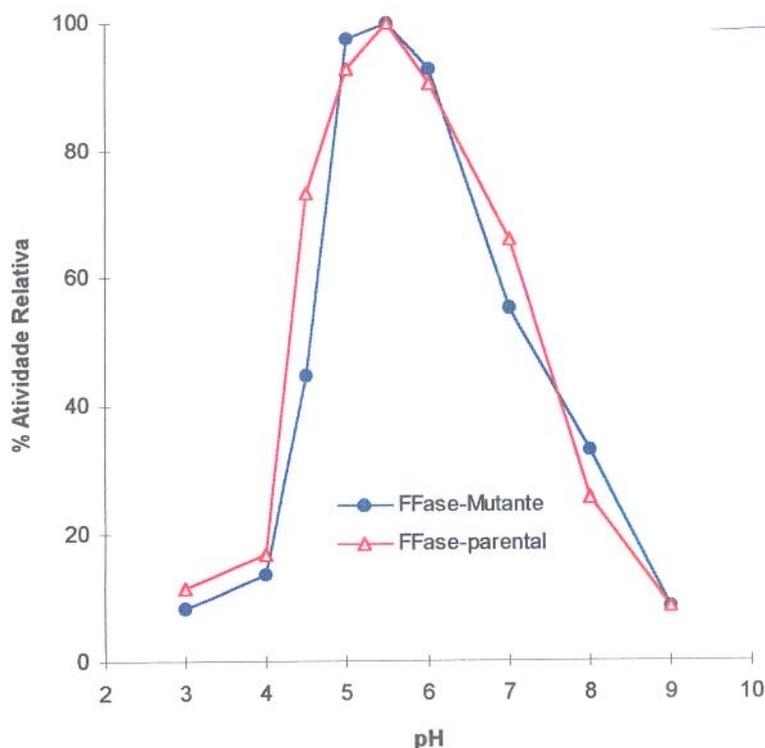


Figura 8: Efeito do pH nas atividades das β -frutofuranosidases bruta das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

10245 e *Aureobasidium* sp ATCC 20524, que apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 5,0-6,0, (JUNG *et alii*, 1989; HAYASHI *et alii*, 1990, respectivamente); *Aspergillus japonicus*, na faixa de 5,0-5,5 (HAYASHI *et alii*, 1992b); *Aureobasidium* sp 771-1, pH ótimo em 5,3 (OLIVEIRA, 1997). A β -frutofuranosidase de *Scopulariopsis brevicaulis* apresentou pH ótimo na faixa de 6,5-7,5 (TAKEDA *et alii*, 1994).

Neste experimento, foi observado que na faixa de pH 3,0-4,5 ocorreu hidrólise na molécula de sacarose provocada pelo efeito do pH (hidrólise química), e consequentemente superestimando os valores obtidos quando determinados pelo teste de glicose oxidase. Para eliminar este inconveniente, incluiu para cada amostra um tubo controle, onde só não se adicionou o extrato enzimático. O valor apresentado no tubo controle foi subtraído do tubo amostra.

4.4.2. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O efeito do pH na estabilidade das enzimas β -frutofuranosidases brutas de ambas linhagens mutante e parental de *A. niger*, expressas em % de atividade relativa, conforme descrito no ítem 3.4.2., estão registrados nos gráficos da figura 9. Observa-se que as duas enzimas oriundas de linhagens diferentes (mutante e parental) apresentaram praticamente os mesmos resultados quanto ao efeito do pH sobre a enzima, sendo ambas enzimas estáveis na faixa de pH 4,5-6,0 (atividade acima de 80 %), e a melhor estabilidade para ambas foi registrado no pH 5,5. Quando expostas aos pH 3,0 e 9,0 as enzimas apresentaram suas atividades fortemente reduzidas.

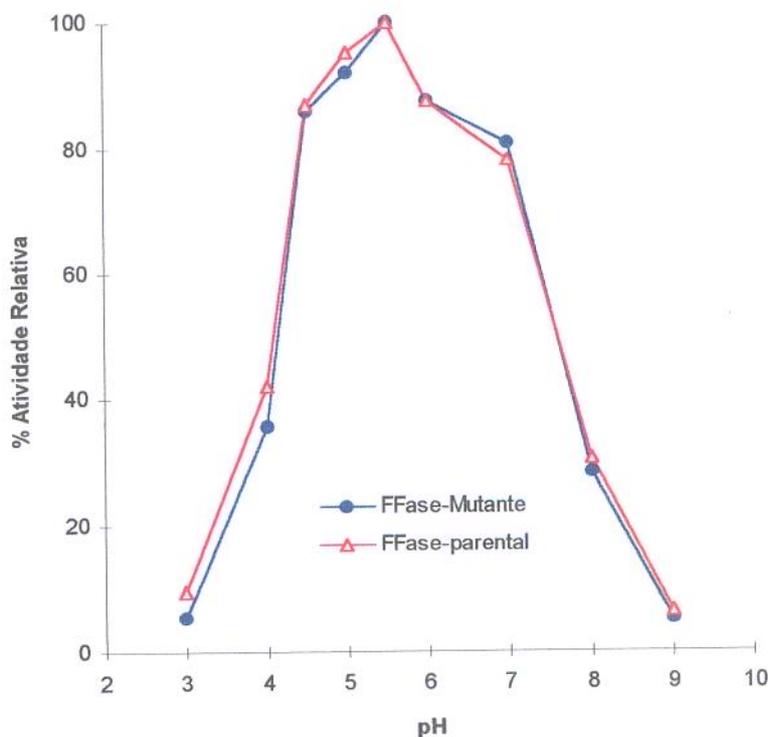


Figura 9: Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

HAYASHI *et alii* (1992b) relataram que a β -frutofuranosidase bruta de *Aspergillus japonicus* mostrou-se estável na faixa de pH 4,0-9,0, restando 90% de sua atividade após 15 minutos de ação do pH sobre a enzima. As enzimas β -frutofuranosidase bruta intracelular de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1990) e extracelular de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997) também apresentaram estabilidade na faixa de pH 5,0-6,0. Vale ressaltar que o efeito de hidrólise ácida sobre o substrato foi observado nos pH 3,0, 4,0 e 4,5, e o mesmo procedimento utilizado no item 4.4.1. para eliminar este interferente foi também adotado neste item.

4.4.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A figura 10 representa os gráficos referente ao estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, expresso em % de atividade relativa, conforme descrito no item 3.4.3. Verifica-se, como já ocorrido com pH ótimo e de estabilidade, conforme os itens 4.4.1. e 4.4.2., respectivamente, que ambas enzimas apresentaram as mesmas características quanto ao efeito da temperatura na ação das enzimas, apresentando uma atividade ótima na faixa de 50-55 °C. Na temperatura de 60 °C, ambas enzimas apresentaram atividade relativa de 90%, mas a 70 °C foi obtido apenas 10% de atividade relativa.

Estes dados conferem com os da literatura, onde a faixa ótima de temperatura para as diferentes β -frutofuranosidases brutas microbianas situaram em torno de 50-60 °C, como em *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245 (JUNG *et alii*, 1989), *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1990), *Aspergillus japonicus* (HAYASHI *et alii*, 1992b), *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997), entretanto, a β -frutofuranosidase de *Scopulariopsis brevicaulis* apresentou temperatura ótima na faixa de 25-30 °C (TAKEDA *et alii*, 1994).

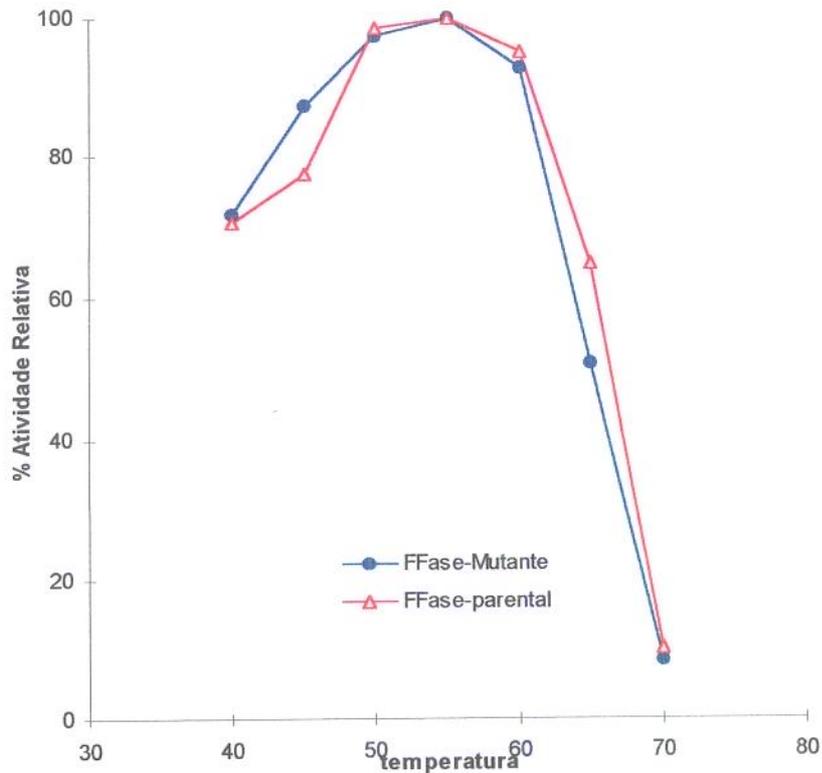


Figura 10: Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases brutas das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

4.4.4. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES BRUTAS DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

No gráfico da figura 11, que expressa o efeito da temperatura na estabilidade das enzimas β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *A. niger*, conforme descrito no item 3.4.4. Nota-se que ambas enzimas apresentaram as mesmas características quanto ao efeito da temperatura sobre a enzima, sendo que na faixa de 40 a 60 °C a enzima quase não foi afetada pela temperatura quando exposta por 30 minutos, entretanto, foram praticamente inativadas a 70 °C.

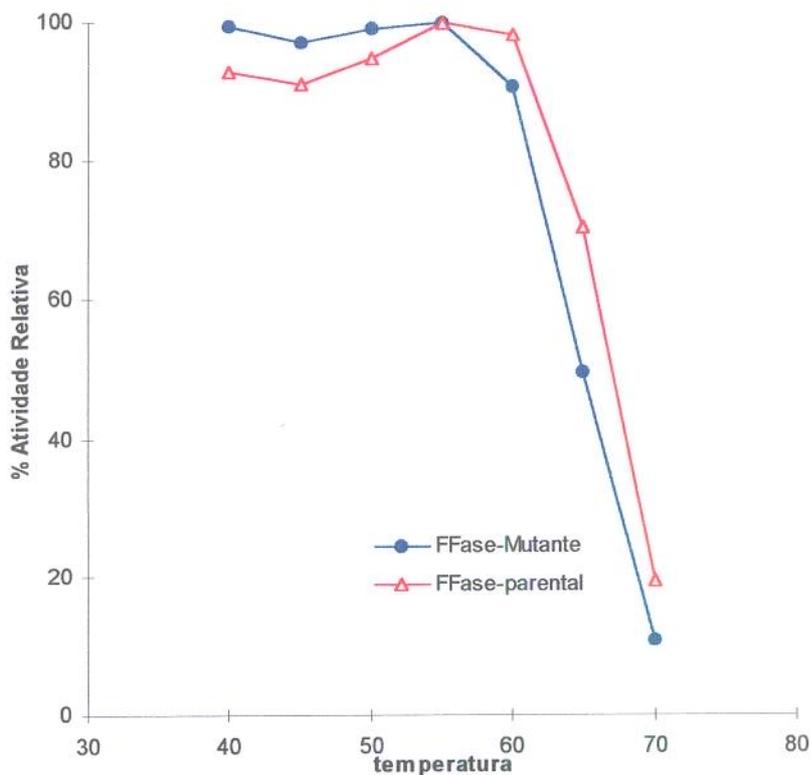


Figura 11: Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidas brutas das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

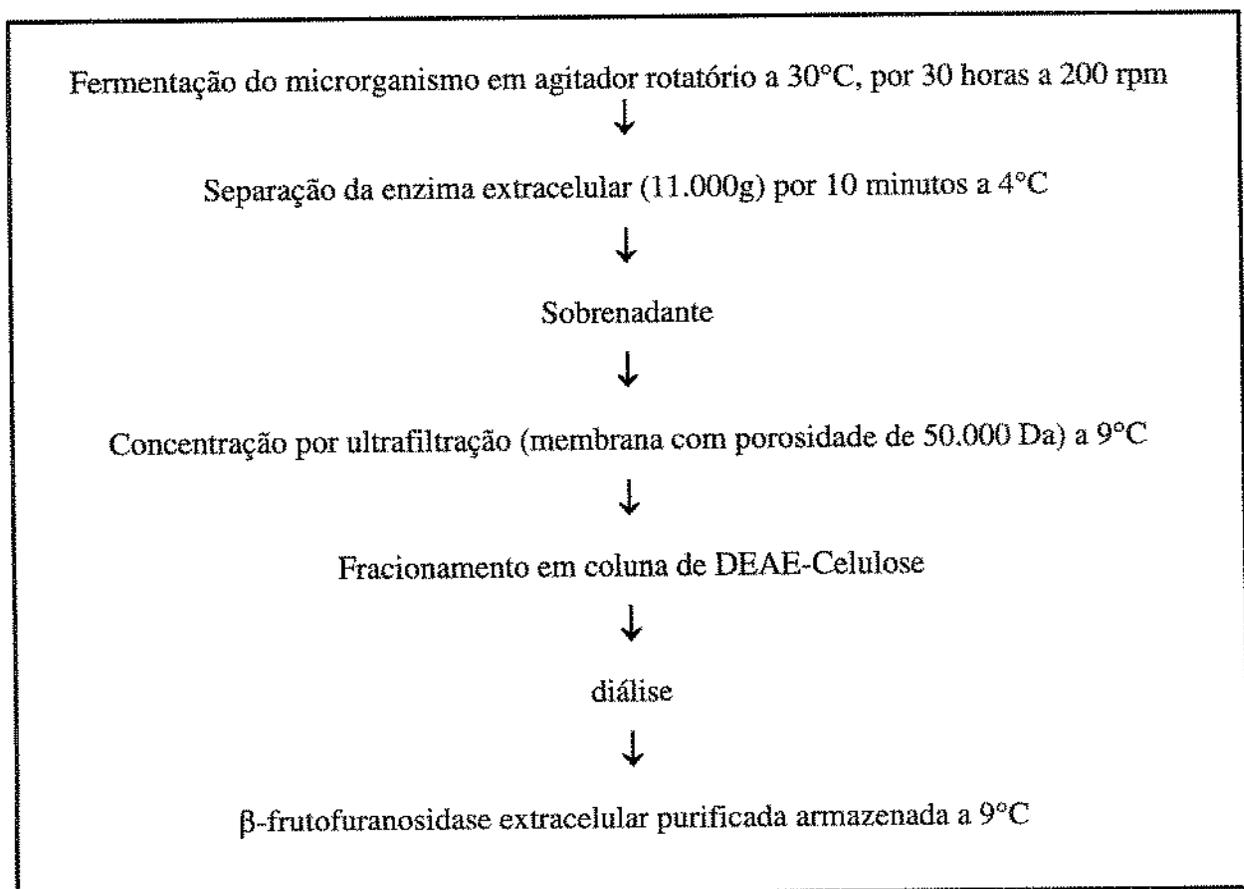
Estes valores coincidem com os apresentados pelas β -frutofuranosidas brutas de *Aureobasidium* sp ATCC 20524, *Aspergillus japonicus* e *Aureobasidium* sp 771-1, relatadas por HAYASHI *et alii* (1990), HAYASHI *et alii* (1992b) e OLIVEIRA (1997), respectivamente, as quais mostraram-se estáveis em temperaturas inferiores a 60 °C apresentando valores de atividade relativa superiores a 80%, e foram praticamente inativadas quando expostas à temperatura de 70 °C.

Nota-se que as preparações brutas das β -frutofuranosidas obtidas a partir das linhagens mutante e parental, não apresentaram nenhuma diferenciação entre si quanto ao pH e temperatura ótima para reação, e também quanto à estabilidade das enzimas frente à variação de pH e temperatura.

4.5 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES EXTRACELULARES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A produção e purificação das β -frutofuranosidases extracelulares das linhagens mutante e parental de *A. niger* foram realizadas de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.5.1. e 3.5.2. O fluxograma de produção e purificação das enzimas é ilustrado na tabela 4.

Tabela 4: Fluxograma da obtenção das enzimas β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente produzidas pelas linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*



4.5.1 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULARES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Os sobrenadantes contendo as enzimas β -frutofuranosidases extracelulares das linhagens mutante e parental de *A. niger*, conforme descrito no ítem 3.3, foram concentradas cerca de 5 vezes por ultrafiltração, utilizando membrana com porosidade de 50.000 Da, o volume final foi 18 ml para linhagem mutante, e 15 ml para a parental. A atividade enzimática do extrato da β -frutofuranosidase da linhagens mutante aumentou de 11,4 U/ml para 48,6 U/ml e da linhagem parental 5,71 U/ml para 24,35 U/ml.

4.5.2. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS β -FRUTOFURANOSIDASES DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*, ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

A purificação parcial das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental, representadas nas figuras 12 e 13, foi realizada como descrito no ítem 3.5.2. A figura 12 ilustra a purificação parcial da β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *Aspergillus niger* em coluna DEAE-Celulose. Observa-se que a enzima β -frutofuranosidase da linhagem mutante foi eluída na presença de 0,1 M de NaCl. Os demais picos de eluição proteica não apresentaram atividade de β -frutofuranosidase.

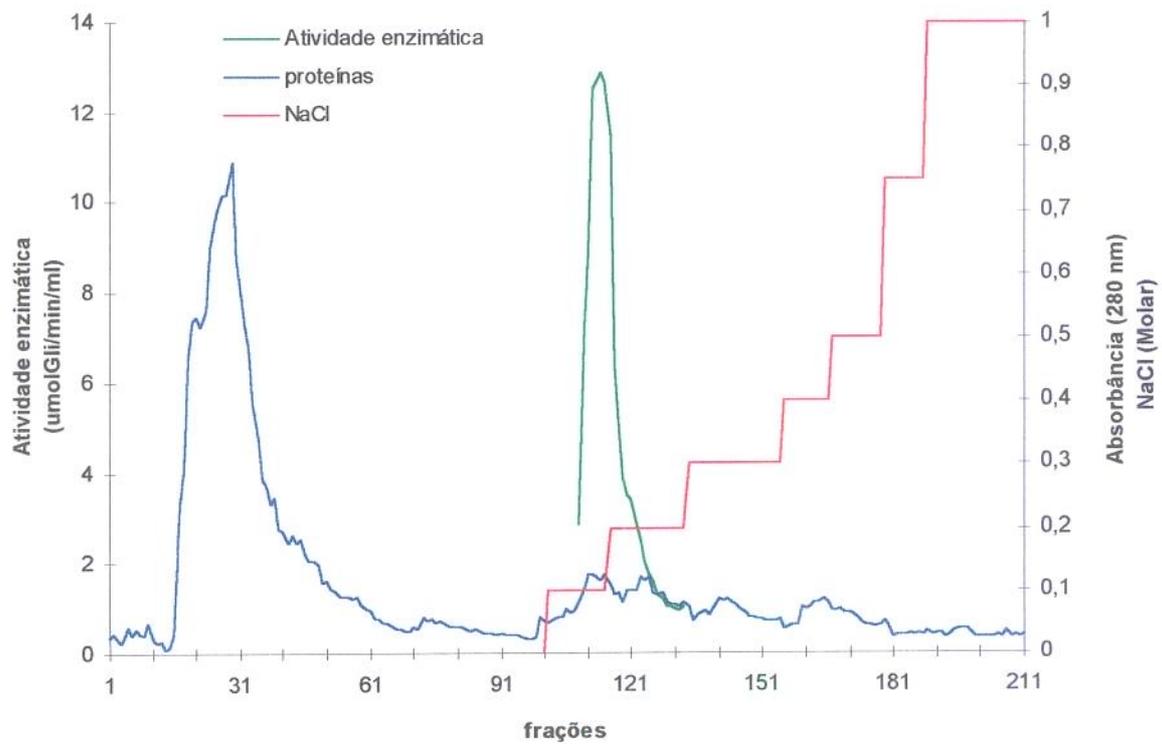


Figura 12: Cromatografia da β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *Aspergillus niger* em coluna de DEAE-Celulose

A figura 10 ilustra que na purificação da enzima da linhagem parental de *Aspergillus niger* em coluna de DEAE-Celulose, essa foi eluída com tampão contendo 0,2 M de NaCl. Os demais picos de eluição proteica não apresentaram atividade de β -frutofuranosidase.

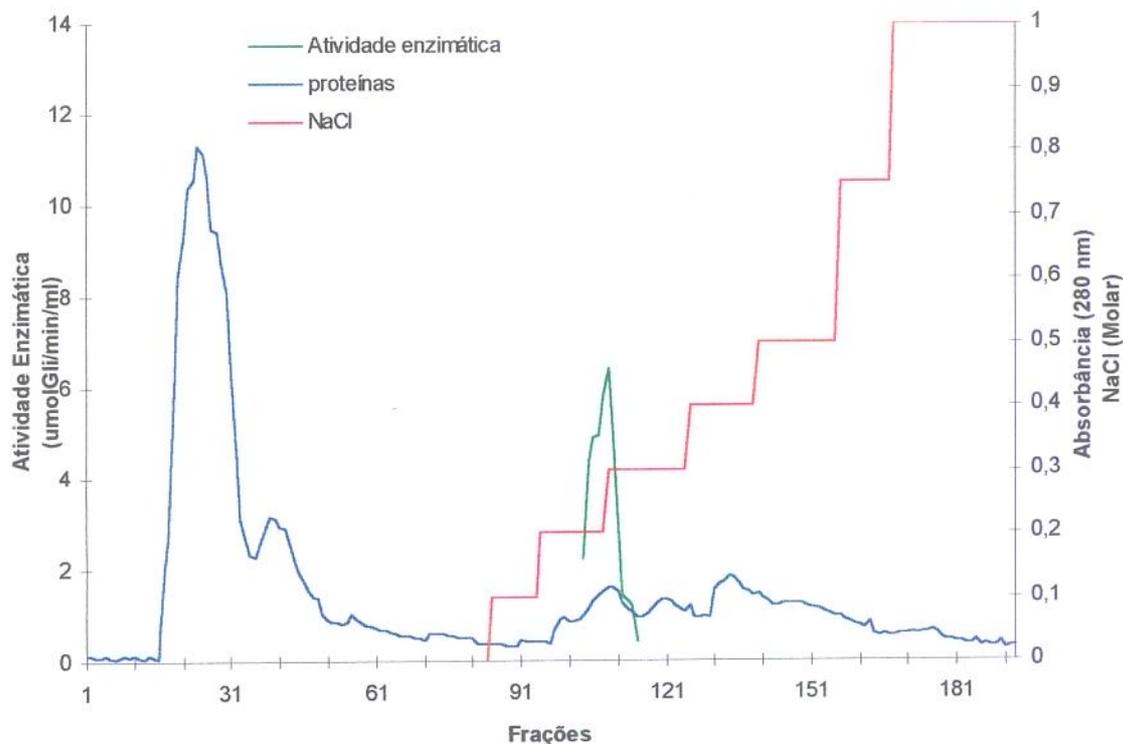


Figura 13: Cromatografia da β -frutofuranosidase da linhagem parental de *Aspergillus niger* em coluna de DEAE-Celulose

As tabelas 5 e 6 mostram as etapas de purificação parcial das β -frutofuranosidasas das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*. A preparação enzimática de β -frutofuranosidase da linhagem parental de *Aspergillus niger* obtida após purificação em coluna de DEAE-Celulose e diálise apresentou 15,4 unidades/ml enquanto que a da linhagem mutante apresentou 15,8 unidades/ml. Ambas apresentaram uma perda de 50% na sua atividade durante a etapa de cromatografia em DEAE-Celulose.

Tabela 5: Etapas da purificação de β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *Aspergillus niger*

Etapas de purificação	Volume (ml)	Atividade (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg prot)	Recuperação (%)	Purificação
sobrenadante fermentado	90	11,4	42,0	1026	3780	0,27	100	1
concentrado por ultrafiltração	18	48,6	194	874,8	3492	0,25	85	0,93
cromatografia em DEAE-Celulose	35	12,2	2,8	427	98	4,35	41,6	16,1
diálise	35	11,5	2,7	402,5	94,5	4,26	39,2	15,8

Tabela 6: Etapas da purificação de β -frutofuranosidase da linhagem parental de *Aspergillus niger*

Etapas de purificação	Volume (ml)	Atividade (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg prot)	Recuperação (%)	Purificação
sobrenadante fermentado	90	5,71	52,7	513,9	4743	0,108	100	1
concentrado por ultrafiltração	18	24,35	246	438,3	4428	0,099	85,3	0,92
cromatografia em DEAE-Celulose	35	5,0	2,9	175	101,5	1,72	34,1	15,9
diálise	35	4,65	2,8	162,7	98	1,66	31,7	15,4

4.6. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

4.6.1. DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A figura 14 ilustra o efeito do pH na atividade enzimática das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger*, expressas em % de atividade relativa. As β -frutofuranosidases purificadas das linhagens mutante e da parental apresentaram atividade ótima na faixa de pH 5,5-6,0 e pH 5,0-6,0, respectivamente. No pH 6,5 ambas enzimas apresentaram atividade acima de 80 % da ótima. Em pH 3,0 e nos acima de pH 8,0 a atividade relativa de β -frutofuranosidase a 55 °C foi inferior a 20% da ótima, sendo praticamente inativadas em pH 9,0. Como já esperado, na faixa de pH 3,0-4,5 ocorreu hidrólise química da sacarose, como comentado no ítem 4.4.1.

Nesta faixa de pH 5,0-6,0 em que as enzimas β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger* apresentaram atividade ótima, as β -frutofuranosidases purificadas oriundas de outros microrganismos também apresentaram atividade ótima nesta mesma faixa (pH 5,0-6,0), como a intracelular de *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA *et alii*, 1989), extracelular de *Aspergillus niger* (PARK & ALMEIDA, 1991), intracelular de *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992c), intra e extracelular de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992a e 1992e, respectivamente), intracelular de *Aureobasidium pullulans* C-23 (LEE *et alii*, 1992), *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994) e extracelular de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997).

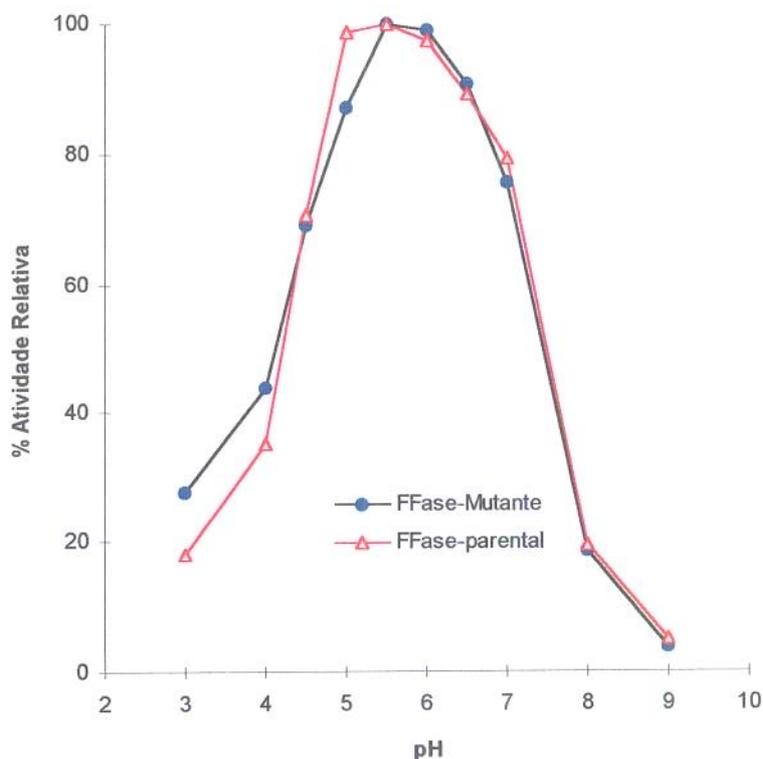


Figura14: Efeito do pH na atividade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

4.6.2. DETERMINAÇÃO DO pH DE ESTABILIDADE DAS β -FRUTO-FURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O efeito do pH na atividade das enzimas β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger*, expressas em % de atividade relativa, estão registrados nos gráficos da figura 15. As β -frutofuranosidases purificadas das linhagens mutante e parental apresentaram maior estabilidade na faixa de pH 5,0-6,0. Nos pH 3,0 e 9,0 as enzimas foram inativadas.

As β -frutofuranosidasas apresentam diferente faixa de pH de estabilidade dependendo da fonte microbiana. A β -frutofuranosidase intracelular de *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992c), *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992e) e *Aureobasidium pullulans* (LEE *et alii*, 1992) apresentaram maior estabilidade na faixa de pH de 4,0-9,0, enquanto que a enzima extracelular de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997) na faixa de 4,5-6,0. As β -frutofuranosidasas extracelulares de *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA *et alii*, 1989), *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994), *Aspergillus niger* (PARK & ALMEIDA, 1991), *Arthrobacter* sp K-1 (FUJITA *et alii*, 1990) e *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 (DUAN *et alii*, 1993) mostraram estabilidade nas faixas de 4,5-10,0, 5,0-8,0, 5,5-6,5, 5,5-10,0 e 7,0-8,5, respectivamente.

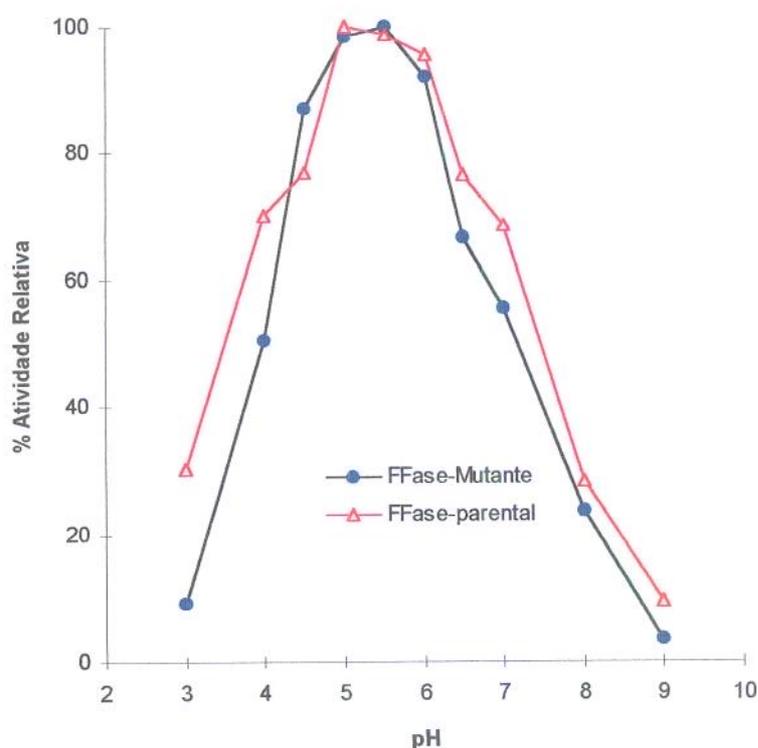


Figura 15: Efeito do pH na estabilidade das β -frutofuranosidasas extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *Aspergillus niger*.

4.6.3. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

A figura 16 representa os gráficos referentes ao estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger*, expresso em % de atividade relativa. Verifica-se que a temperatura ótima para ambas enzimas purificadas apresentou-se na faixa de 50-60 °C, igualmente quando presente na forma bruta, conforme descrito no item 4.4.3.

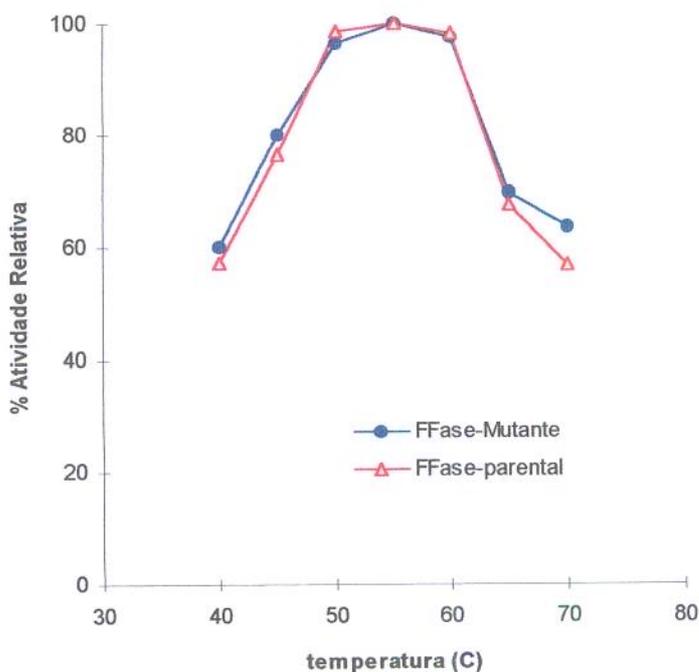


Figura 16: Efeito da temperatura na atividade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*.

As β -frutofuranosidases purificadas oriundas de outros microrganismos também apresentaram atividade ótima entre 50 e 60 °C, como as intracelulares de *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA *et alii*, 1989), de *Aspergillus japonicus* TIT-kj1 (DUAN *et alii*, 1993), de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992a), de *Aureobasidium pullulans* C-23 (LEE *et alii*, 1992) e de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994), e as extracelulares de *Aspergillus niger* (PARK & ALMEIDA, 1991), de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992e) e de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997).

4.6.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE ESTABILIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

Os gráficos da figura 17 expressam o efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger*. Observa-se que as enzimas permaneceram estáveis em temperaturas inferiores a 55 °C após 30 minutos de tratamento. Após tratamento durante 30 minutos a 60 °C, as enzimas apresentavam 80% ou mais da atividade inicial, sendo inativadas na temperatura de 70°C.

A maioria dos trabalhos publicados revelam que a enzima β -frutofuranosidase na forma purificada apresentam mais que 80% da atividade inicial em temperaturas inferiores a 50 °C, como a intracelular de *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA *et alii*, 1989), intra e extracelular de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992a e 1992e, respectivamente). Porém, a temperatura de estabilidade da enzima intracelular de *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992c) foi inferior a 60 °C; já para a de *Arthobacter* sp K-1 (FUJITA *et alii*, 1989) foi inferior a 45 °C.

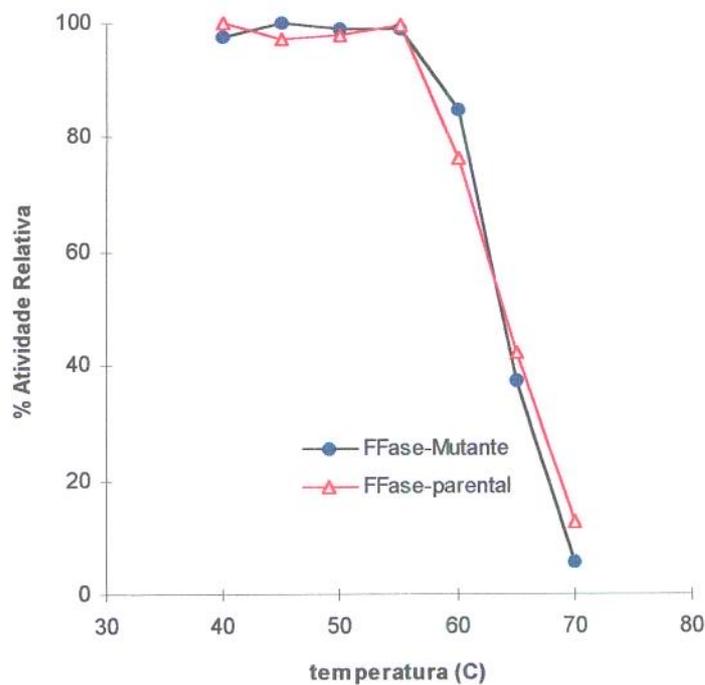


Figura 17: Efeito da temperatura na estabilidade das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutantes e parental de *A. niger*.

4.6.5. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O efeito de substâncias químicas inibidoras (arseniato, N-bromosuccinimida, ρ -cloromercuribenzoato, EDTA, ρ -hidroximercuribenzoato, iodoacetamida, e β -mercaptoetanol) e de íons metálicos (Ag^+ , Ca^{2+} ; Co^{2+} ; Cu^{2+} ; Fe^{2+} ; Hg^{2+} ; I_2 ; K^+ ; Mg^{2+} ; Mn^{2+} ; Zn^{2+}) na atividade enzimática das β -frutofuranosidases purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental estão expressos, em % de atividade relativa, nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7: Efeito de inibidores (1 e 10 mM) na atividade da β -frutofuranosidase purificada das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*.

INIBIDOR	ATIVIDADE		RELATIVA (%)	
	10 mM	10 mM	1 mM	1 mM
	Mutante	Parental	Mutante	Parental
arseniato de sódio	112	82	102	91
N-bromosuccinimida	3	7	5	20
<i>p</i> -cloromercuribenzoato	96	77	98	88
EDTA	109	90	100	93
<i>p</i> -hidroximercuribenzoato	82	69	98	85
iodo acetamida	105	78	94	83
β -mercaptoetanol	1	2	19	10
controle	100	100	100	100

Observa-se na tabela 7 que as β -frutofuranosidasas purificadas parcialmente de ambas linhagens foram inativadas pelas substâncias N-bromosuccinimida e β -mercaptoetanol na concentração de 10 mM, e fortemente inibidas com 1 mM. Com os demais inibidores, a atividade enzimática foi pouco afetada, principalmente na concentração de 1 mM. A β -frutofuranosidase produzida pela linhagem parental expressou ser, na maioria dos casos, mais susceptível a ação das substâncias inibidoras que a enzima oriunda da linhagem mutante.

Vale ressaltar que a N-bromosuccinimida atua nas cadeias laterais da proteína com maior velocidade no grupo sulfidrila, depois no indol, fenol e imidazol, ou seja, CYS > TRP > TYR > HIS, respectivamente (FARFAN, 1990). β -mercaptoetanol atua nos grupos tióis, ou seja, nos resíduos de cisteína presentes na proteína.

Na concentração de 0,5 mM, a N-bromosuccinimida inibiu a atividade da β -frutofuranosidase extracelular e purificada de *Aureobasidium pullulans* C-23 (LEE *et alii*, 1991), de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997) e de *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994).

A tabela 8 mostra que as enzimas foram fortemente afetadas com 10mM de AgNO_3 , iodo e HgCl_2 . Este último apresentou ser altamente inibidor para ambas enzimas na concentração de 1 mM. O sal AgNO_3 (10 mM) afetou fortemente a atividade enzimática, mas não de forma tão drástica quanto o iodo e HgCl_2 .

Tabela 8: Efeito de íons metálicos (1 e 10 mM) na atividade da β -frutofuranosidase purificada das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*.

INIBIDOR	ATIVIDADE		RELATIVA (%)	
	10 mM	10 mM	1 mM	1 mM
	Mutante	Parental	Mutante	Parental
AgNO_3	12	17	24	39
CaCl_2	97	94	113	100
CoCl_2	109	186	104	97
CuSO_4	100	223	107	98
Fe_2Cl_3	249	322	183	160
HgCl_2	6	12	5	12
I_2	8	5	70	35
KCl	112	86	102	90
MgSO_4	110	108	109	96
MnCl_2	93	123	112	113
ZnSO_4	83	110	178	150
controle	100	100	100	100

β -frutofuranosidases extracelulares de *Arthrobacter* sp K-1 e *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (FUJITA *et alii*, 1990b), intracelular de *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992c) foram inibidas com 1 mM de sais de prata ou mercúrio. Entretanto, a enzima intracelular de *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 (DUAN *et alii*, 1993) foi inibida pelos sais de prata ou mercúrio na concentração de 5mM.

Os sais de mercúrio e o iodo, na concentração de 1mM, inibiram a atividade da enzima extracelular purificada de *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997). Na concentração de 5 mM, os sais de mercúrio e o iodo inibiram a atividade da enzima extracelular purificada de *Aureobasidium pullulans* C-23 (LEE *et alii*, 1991).

Somente o sal de prata na concentração de 1 mM inibiu a enzima intracelular purificada de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992a, 1992c, 1994a). O sal de mercúrio na concentração de 0,25 e 1 mM inibiram as enzimas de *Aspergillus oryzae* (CHANG *et alii*, 1994) e a extracelular de *Aureobasidium* ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992e).

Observa-se também na tabela 8 que a atividade enzimática, das β -frutofuranosidases das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*, quando determinadas pelo teste de glicose oxidase, foi maior na presença dos íons Fe^{3+} , Co^{2+} e Zn^{2+} .

4.6.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS: K_m e $V_{m\acute{a}x}$ DAS β -FRUTOFURANOSIDASES PURIFICADAS PARCIALMENTE DAS LINHAGENS MUTANTE E PARENTAL DE *A. niger*

O efeito da concentração de sacarose (0,1 a 1M) na atividade das β -frutofuranosidases purificadas, conforme item 3.1.2.1., estão representados nos gráficos da figura 18. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados utilizando-se o método de Augustinsson (WHITAKER, 1972).

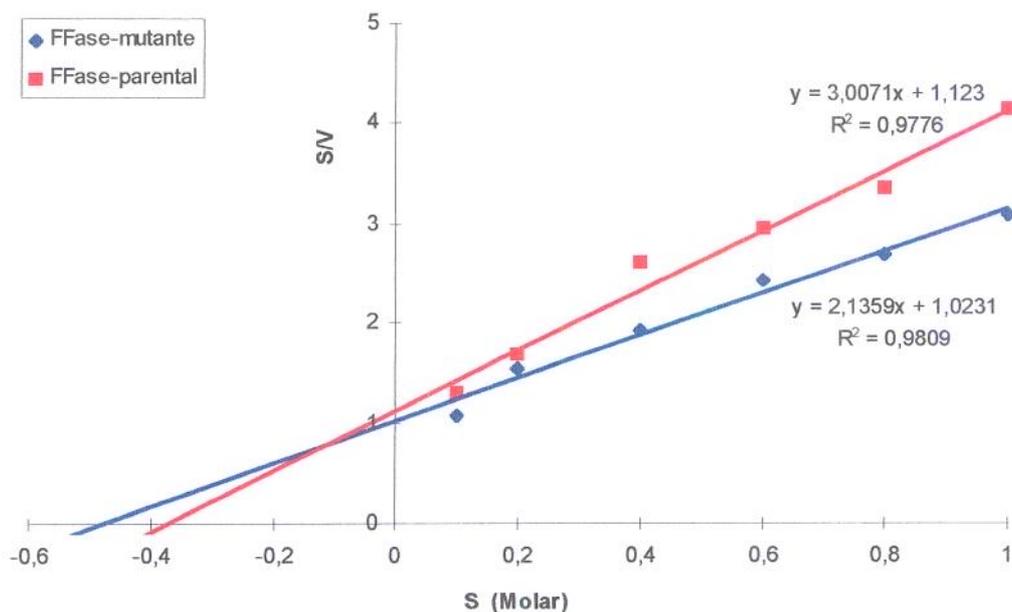


Figura 18: Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de β -frutofuranosidases extracelulares purificadas das linhagens mutante e parental de *Aspergillus niger*, pelo método de Augustinsson.

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da β -frutofuranosidase da linhagem mutante para o substrato sacarose foram respectivamente 0,47 M e 1,02 $\mu\text{mol/ml/min}$, enquanto que para a linhagem parental foram respectivamente 0,37 M e 1,12 $\mu\text{mol/ml/min}$.

As β -frutofuranosidases extracelulares purificadas descritas na literatura apresentaram valores de K_m , utilizando sacarose como substrato, de 0,29 M para *Aspergillus niger* ATCC 20611 (HIRAYAMA *et alii*, 1989), 0,0091 M para *Arthrobacter* sp K-1 (FUJITA *et alii*, 1990b), 0,47 e 0,65 M para frações intracelulares P-1 e P-2, respectivamente, de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1991c), 0,21 M para *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992-c), 0,34 e 0,28 M para frações extracelulares E-1 e E-2, respectivamente, de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992e), 0,43 M para *Aureobasidium pullulans* (LEE *et alii*, 1992), 0,53 M para *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 (CHANG *et alii*, 1994), e 0,36 M para *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ encontrados na literatura para β -frutofuranosidases purificadas, utilizando sacarose como substrato, foram: 6,84 e 8,73 $\mu\text{mol/ml/min}$ para frações intracelulares P-1 e P-2, respectivamente, de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1991c), 0,65 $\mu\text{mol/ml/min}$ para *Aspergillus japonicus* MU-2 (HAYASHI *et alii*, 1992-c), 6,66 e 8,70 $\mu\text{mol/ml/min}$ para frações extracelulares E-1 e E-2, respectivamente, de *Aureobasidium* sp ATCC 20524 (HAYASHI *et alii*, 1992e), e 6,3 $\mu\text{mol/ml/min}$ para *Aureobasidium* sp 771-1 (OLIVEIRA, 1997).

4.7. APLICAÇÃO DAS β -FRUTOFURANOSIDASES EXTRACELULARES PURIFICADAS NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

A produção dos frutooligossacarídeos GF₂, GF₃ e GF₄, glicose, frutose e sacarose utilizando-se β -frutofuranosidase de *A. niger* e soluções com 10, 30, 40 e 50% de sacarose, no decorrer de 2, 6, 12 e 24 horas de reação e analisadas por CLAE, conforme descrito no ítem 3.1.2.2., estão representados nas tabelas 9, 10, 11 e 12 e nas figuras 19, 20, 21 e 22.

A maior proporção de frutooligossacarídeos (54,21%) em relação aos açúcares totais contidos na reação ocorreu no substrato sacarose 30% após 6 horas de incubação (tabelas 9 a 12). Deve-se ressaltar que o GF₂ e GF₃ são os aceptores do grupo frutossila da sacarose na produção GF₃ e GF₄, respectivamente, ou seja, primeiramente será produzido a GF₂, depois a GF₃ e por último a GF₄, conseqüentemente, a concentração dos substratos e o tempo de incubação são importantíssimos na proporção de GF₂/GF₃/GF₄ obtido durante a produção.

Verifica-se que a produção máxima de GF₂ ocorreu em 2 horas de incubação, independente da concentração de sacarose, e em seguida começou a diminuir, sendo que quanto menor a concentração de substrato maior o declíneo. Observa-se que quanto menor a concentração de sacarose, maior é a taxa de glicose e frutose livre. DUAN *et alii* (1993) relatou que a produção comercial de frutooligossacarídeos ocorre em concentrações de sacarose acima de 30%.

Nota-se que neste experimento não ocorreu, ou não foi detectado pelo método utilizado, a presença de GF₄ na concentração de sacarose 10% ao longo de 24 horas de incubação (tabela 9).

Na tabela 9 observa-se claramente que após 24 horas de incubação ocorreu um aumento de 50% na concentração de frutose livre. DUAN *et alii* (1993) já havia observado que a taxa de hidrólise é maior que a de transferência quando a quantidade de sacarose ou 1-kestose for inferior a 5% dos açúcares. Já nas outras concentrações não foi detectado esta elevada hidrólise devido a concentração de sacarose não ser inferior a 5% (tabelas 10, 11 e 12).

Analisando as elevadas concentrações de glicose (tabelas 10 a 12), as quais situaram em torno de 35-45%, e visando a comercialização destes frutooligossacarídeos, este produto torna-se totalmente inviável aos portadores de diabetes e de hiper-insulismo, além de ser calórico, obrigando que o produto tenha no mínimo 90% de frutooligossacarídeos para poder atender a esta faixa de consumidores.

Tabela 9: Conversão de sacarose 10% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24 horas de reação.

Tempo de incubação (horas)	Frutose (%)	Glicose (%)	Sacarose (%)	GF ₂ (%)	GF ₃ (%)	GF ₄ (%)	FOS* (%)
0	0	0	100	0	0	0	0
2	6,52	35,32	6,79	39,14	12,23	0	51,37
6	12,34	48,1	6,21	13,47	19,88	0	33,35
12	14,66	49,84	5,65	13,0	16,85	0	29,85
24	21,15	51,77	3,37	10,64	13,06	0	23,7

* FOS = GF₂ + GF₃ + GF₄

Tabela 10: Conversão de sacarose 30% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24 horas de reação.

Tempo de incubação (horas)	Frutose (%)	Glicose (%)	Sacarose (%)	GF ₂ (%)	GF ₃ (%)	GF ₄ (%)	FOS* (%)
0	0	0	100	0	0	0	0
2	1,89	33,59	16,15	38,47	9,9	0	48,36
6	2,8	35,21	7,78	34,79	18,19	1,43	54,41
12	4,6	41,66	6,84	23,65	20,82	2,41	46,88
24	5,29	46,71	5,19	14,12	20,55	8,13	42,8

* FOS = GF₂ + GF₃ + GF₄

Tabela 11: Conversão de sacarose 40% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24horas de reação.

Tempo de incubação (horas)	Frutose (%)	Glicose (%)	Sacarose (%)	GF ₂ (%)	GF ₃ (%)	GF ₄ (%)	FOS* (%)
0	0	0	100	0	0	0	0
2	1,12	31,82	19,05	40,22	7,8	0	48,02
6	1,98	39,55	7,35	31,19	18,09	1,97	51,25
12	2,69	43,04	6,49	22,58	23,11	2,09	47,78
24	3,85	45,78	6,26	13,91	24,0	6,2	44,11

* FOS = GF₂ + GF₃ + GF₄

Tabela 12: Conversão de sacarose 50% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24horas de reação.

Tempo de incubação (horas)	Frutose (%)	Glicose (%)	Sacarose (%)	GF ₂ (%)	GF ₃ (%)	GF ₄ (%)	FOS* (%)
0	0	0	100	0	0	0	0
2	0,82	27,98	24,08	37,17	9,95	0	47,12
6	1,64	38,86	8,51	35,16	15,53	0,3	50,99
12	1,9	41,88	6,86	25,75	21,67	1,94	49,36
24	2,66	44,58	5,65	15,44	26,93	4,75	47,12

* FOS = GF₂ + GF₃ + GF₄

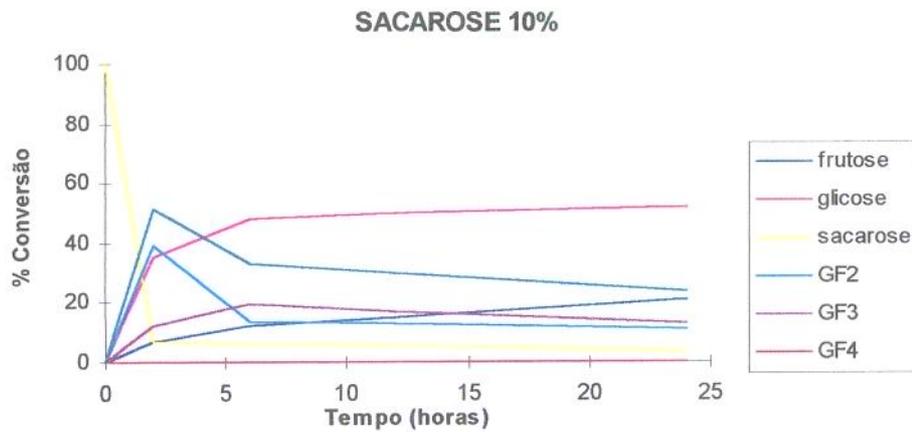


Figura 19: Conversão de sacarose 10% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24 horas de reação.

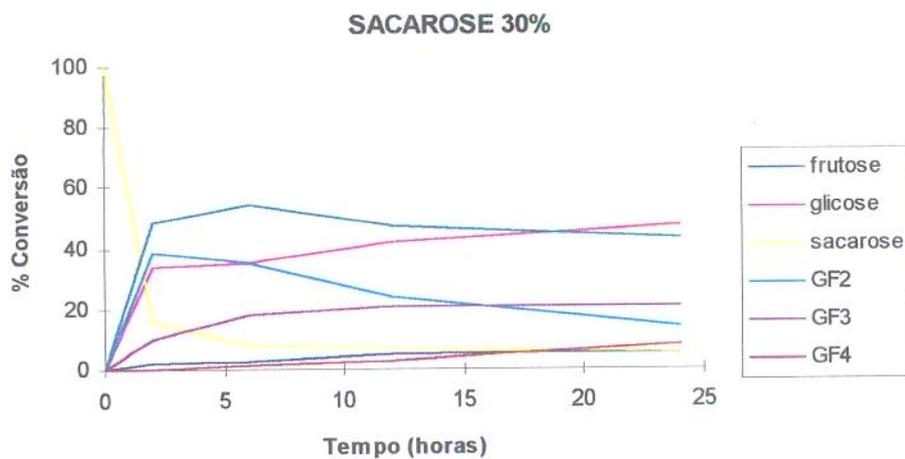


Figura 20: Conversão de sacarose 30% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24 horas de reação.

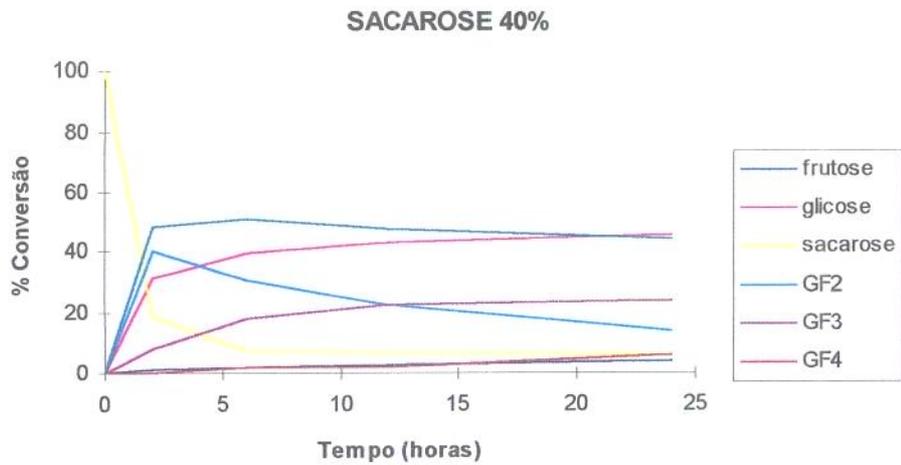


Figura 21: Conversão de sacarose 40% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24horas de reação.

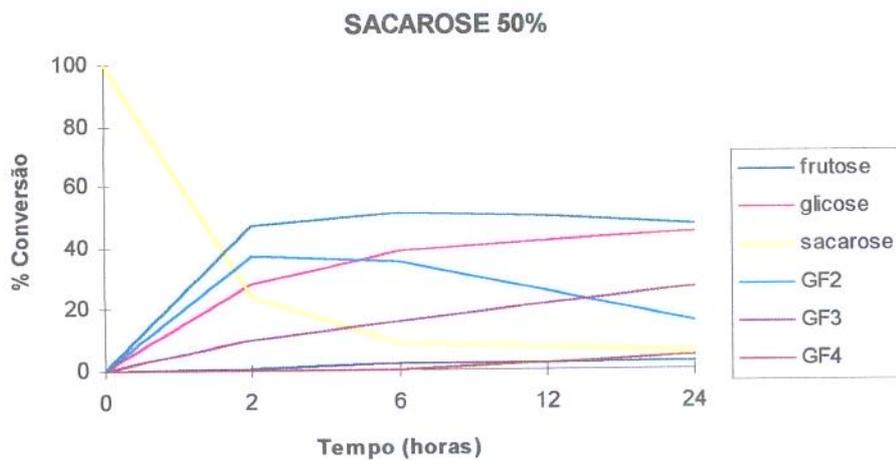


Figura 22: Conversão de sacarose 50% em frutooligossacarídeos, glicose e frutose pela β -frutofuranosidase da linhagem mutante de *A. niger* durante 24horas de reação.

6. CONCLUSÕES

- 1) Foram isoladas e testadas, quanto a produção de β -frutofuranosidase extracelular, 300 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas após tratamento dos esporos da linhagem de *A. niger* com agente mutagênico N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina (M.N.N.G.).
- 2) As colônias mutantes apresentaram duas características morfológicas distintas: Tipo P (preta): 269 colônias com coloração negra, típica *A. niger*; Tipo B (bege): 31 colônias com coloração bege, atípica de *A. niger*, que apresentou esporos de menor tamanho e em menor quantidade do que os da linhagem parental.
- 3) Uma linhagem mutante (M.N.N.G.) do tipo B (bege) se destacou por ter apresentando quase que o dobro de atividade de β -frutofuranosidase extracelular, quando comparada com a linhagem parental. Esporos desta linhagem mutante foram submetidos à radiação ultravioleta e 37 novas UFC sobreviveram ao tratamento, todas com coloração bege. Uma linhagem, a de nº 12, se destacou por apresentar maior atividade de β -frutofuranosidase extracelular com atividade de transferência (9,02 U) do que a linhagem parental (4,37 U).
- 4) As β -frutofuranosidases extracelulares brutas das linhagens mutante e parental apresentaram atividade ótima em pH e temperatura semelhantes, 5,5 e 50-55 °C, respectivamente, e estabilidade na faixa de pH 4,5-6,0 e em temperaturas inferiores a 60 °C, após 30 minutos de tratamento.

- 5) A β -frutofuranosidase extracelular parcialmente purificada das linhagens mutante e parental de *A. niger* apresentaram atividade ótima na faixa de temperatura 50-55 °C, estabilidade na faixa de pH 5,5-6,0 e em temperaturas inferiores à 55 °C, mas diferiram quanto ao pH ótimo, sendo na faixa de 5,5-6,0 para a linhagem mutante e de 5,0-6,0 para a parental.
- 6) Os valores de K_m das β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger* foram respectivamente 0,47 e 0,37 M para o substrato sacarose, e os valores de $V_{m\acute{a}x}$ foram 1,02 e 1,12 $\mu\text{molglicose/ml/minuto}$, respectivamente.
- 7) As atividades de β -frutofuranosidases extracelulares purificadas parcialmente das linhagens mutante e parental de *A. niger* foram inibidas na concentração de 1 mM de N-bromosuccinimida, β -mercaptoetanol, HgCl_2 e iodo , e na concentração de 10 mM de AgNO_3 .
- 8) O maior rendimento de frutooligossacarídeos (54,41%) em relação aos açúcares totais foi obtido utilizando-se β -frutofuranosidase e 30% substrato sacarose em tampão citrato-fosfato pH 5,5 após 6 horas de incubação a 55 °C. A concentração de substrato e o tempo de incubação são importantes para obter a proporção de $\text{GF}_2/\text{GF}_3/\text{GF}_4$ desejada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBON, N.; BELL, D.J.; BLANCHARD, P.H.; GROSS, D.; RUNDELL, J.T. Kestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 24-27, 1953.
- ARAI, S. Studies of functional foods in Japan - state of the art. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, v. 60, p. 9-15, 1996.
- AZEVEDO, J.L. A genética microbiana e suas aplicações. **IN: A genética de microrganismo em biotecnologia e engenharia genética. FEALQ. cap. I.10 p. 83-88. Piracicaba. 1985.**
- BACON, J.S.D. The oligosaccharides produced by the action of yeast invertase preparations on sucrose. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 320-328, 1954.
- BACON, J.S.D.; BELL, D.J. A new trisaccharide produced from sucrose by mould invertase. **Journal of the Chemical Society**, v. 3, p. 2528-2530, 1953.
- BACON, J.S.D.; EDELMAN, J. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other *Compositae*. **The Biochemical Journal**, v. 48, p. 114-126, 1951.
- BALL, C. Melhoramento genético de microrganismos. **IN: A genética de microrganismo em biotecnologia e engenharia genética. FEALQ. cap. I.9 p. 77-81. Piracicaba. 1985.**
- BARTHOMEUF, C.; POURRAT, H. Production of high-content fructo-oligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 911-916, 1995.
- BEALING, F.J. Mould "glucosaccharase": a fructosidase. **The Biochemical Journal**, v. 55, p. 93-101, 1953.
- BEALING, F.J.; BACON, J.S.D. The action of mould enzymes on sucrose. **The Biochemical Journal**, v. 53, p. 277-285, 1953.
- BINKLEY, W.W.; ALTENBURG, F.W. Nistose, a fructosyl-1-kestose. **The International Sugar Journal**, v. 67, p. 110-112, 1965.

- CALIL, M.R. Isolamento e análise genética de mutante de *Aspergillus niger* com aumento da produção de amiloglicosidase. Campinas, IB/UNICAMP 108p. (tese de mestrado) 1988.
- CARLSSON, N.G.; KARLSSON, H.; SANDBERG, A.S. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p.2404-2412, 1992.
- CARPITA, N.C.; KANABUS, J.; HOUSLEY, T.L. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinacea* Leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 162-168, 1989.
- CHANG, C.T.; LIN, Y.Y. TANG, M.S.; LIN, C.F. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 32, p. 269-277, 1994.
- CHEETHAM, P.S.J.; GARRET, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985.
- CHEETHAM, P.S.J.; HACKING, A.J.; VLITOS, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p.212-219, 1989.
- CHEN, W.C. β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* in shaking batch cultures as affected by inicial concentration **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 69-72, 1996.
- CHILDS, N. Functional foods and market entry. **The World of Ingredients**, p. 36-39, oct/nov, 1994.
- CPC INTERNATIONAL INC., R.E. Heady. **Preparation of high fructose syrups from sucrose**. Int. Cl.³ C 12 P 19/24. U.S. n. 4276379. 9 jun. 1978; 30 jun. 1981.
- DAS, A. Strain selection in citric acid fermentation - A review. **Current Science**, v. 41, p. 593-596, 1972.
- DALE, J. Applications of the principles of microbial genetics to biotechnology. IN: Principles of biotechnology. ed. Alan Wisemam. Surrey University Press. New York. 1983.
- DICKERSON, A.G. A β -D-frutofuranosidase from *Claviceps purpurea*. **The Biochemical Journal**, v. 129, p. 263-272, 1972.

- DILLER, V.M.; TYTTEL, A.A. and KERSTEN, H. Mutation of *A. niger* variants by means of soft-X-rays. **Journal of Bacteriology**, v. 51, p. 404, 1946.
- DUAN, K.J.; SHEU, D.C.; CHEN, J.S. Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1811-1815, 1993.
- DUAN, K.J.; CHEN, J.S.; SHEU, D.C. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, p. 334-339, 1994.
- DZIEZAK, J.D. Special report: sweeteners and product development. **Food Technology**, v. 40, p. 111-128, 1986.
- EDELMAN, J. Transfer reactions catalysed by some sucrase preparations. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 22-33, 1954.
- EDELMAN, J. The formation of oligosaccharides by enzymic transglycosylation. **Advances in Enzymology**, v. 17, p. 189-232, 1956.
- EDELMAN, J.; BACON, J.S.D. Transfructosidation in extracts of the tubers of *Helianthus tuberosus* L. **The Biochemical Journal**, v. 49, p. 529-540, 1951.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus* L. **New Phytologist**, v. 67, p.517-531, 1968.
- FISHBEIN, L.; KAPLAN, M.; GOUGH, M. Fructooligosaccharides: a review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 30, p. 104-107, 1988.
- FUCHS, A. Current and potential food and non-food applications of fructans. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 555-560, 1991.
- FUJITA, K.; KUWAHARA, N.; TANIMOTO, T.; KOIZUMI, K.; IZUKA, M.; MINAMIURA, N.; FURUICHI, K.; KITAHATA, S. Chemical structures of heterooligosaccharides produced by *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 239-243, 1994.
- FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp K-1 **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 2655-2661, 1990a.

- FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Purification and some properties of β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter sp* K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, p. 913-919, 1990b.
- GARDNER, J.F.; JAMES, L.V. and RUBBO, S.D. Production of citric acid by mutants os *A. niger*. **Journal of General Microbiology**, v. 14, p. 228-237, 1956.
- GERHARDT, P.; DORREL, W.W. and BALDWIN, I.L. Citric acid fermentation of beet molasses. **Journal of Bacteriology**, v. 52, p. 555-564, 1946.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. **Food Microbiology**, v. 11, p. 491-498, 1994a.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 412-420, 1994b.
- GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; LOO, J.V. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria - implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 381-387, 1994.
- GRAEL, E.T. & MENEZES, T.J.B. Produção de α -amilase: características morfológicas do *B. amyloliquefaciens* visando ao melhoramento genético. **Coletânea ITAL**, v. 19, p. 70-76, 1989.
- GROSS, D. BLANCHARD, P.H.; BELL, D.J. Neokestose: a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. **Journal of the Chemical Society**, v. 2, p. 1727-1730, 1954.
- GUPTA, A.K.; BHATIA, I.S. Glucofructosan Biosynthesis in *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2557-2563, 1980.
- GURGEL, J.T.A. Recombinação em bactérias. IN: A genética de microrganismo em biotecnologia e engenharia genética. FEALQ. cap. I.3 p. 17-27. Piracicaba. 1985.
- HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E.; JANG, K.Y. Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 295-298, 1995.
- HANKIN, L.; McINTYRE, J.L. Production of kestose (fructosyl sucroses) by *Phytophthora parasitica var. nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 522-524, 1977.

- HAYASHI, S.; HAYASHI, T.; KINOSHITA, J. TAKASAKI, Y. & IMADA, K.
 Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524 on porous silica. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 247-250, 1992a.
- HAYASHI, S.; IMADA, K.; KUSHIMA, Y.; UENO, H. Observation of the chemical structure of fructooligosaccharide produced by an enzyme from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Current Microbiology**, v. 19, p. 175-177, 1989.
- HAYASHI, S.; ITO, K.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K.
 Immobilization of a fructosyl-transferring enzyme from *Aureobasidium sp.* on shirasu porous glass. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 68-70, 1991a.
- HAYASHI, S. KINOSHITA, J.; NONOGUCHI, M. TAKASAKI, Y.; IMADA, K.
 Continuous production of 1-kestose by β -fructofuranosidase immobilized on shirasu porous glass. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 395-398, 1991b.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; INOMATA, Y.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K.
 Properties of *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase immobilization on porous silica. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 216-220, 1993.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 155-159, 1992b.
- HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K.
 Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 276-279, 1992c.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; IMADA, K.; UENO, H. Production of a fructosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, p. 395-400, 1990.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K.
 Effect of deglycosylation on the properties of β -fructofuranosidase P-1 from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 251-255, 1992d.
- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; SHIMOKAWA, Y.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Purification and properties of extracellular β -fructofuranosidases from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 145-147, 1992e.

- HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y. UENO, H.; IMADA, K.
Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 251-256, 1991c.
- HAYASHI, S.; SASAO, S. TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* on DEAE-cellulose. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 103-105, 1994a.
- HAYASHI, S. SHIMOKAWA, Y.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K.
Properties of the glycosylated β -fructofuranosidase P-2 from *Aureobasidium sp.* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 191-194, 1992f.
- HAYASHI, S.; TUBOUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Long-term continuous reaction of immobilized β -fructofuranosidase. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 227-228, 1994b.
- HAYASHIDA, S. & FLOR, P.Q. Raw starch-digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var. Kawachi. **Agricultural Biological and Chemistry**, v. 45, p. 2675-2681, 1981.
- HENDERSON, R.W.; MORTON, R.K.; RAWLINSON, W.A. Oligosaccharide synthesis in the banana and its relationship to the transferase activity of invertase. **The Biochemical Journal**, v.72, p. 340-344, 1959.
- HENRIQUES, J.A.P. & QUEROL, C.B. Base molecular das mutações. **IN: Genética molecular e de microrganismo.** COSTA, S.O.P. ed. Manole. São Paulo. 1987.
- HENRY, R.J.; DARBYSHIRE, B. Sucrose: sucrose fructosyltransferase and fructan: fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1017-1020, 1980.
- HIDAKA, H.; EIDA, T.; TAKIZAWA, T.; TOKANAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobactéria Microflora**, v. 5:, p. 37-50, 1986.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p. 1181-1187, 1988.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, p. 561-565, 1991.

- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p 667-673, 1989.
- HOUSLEY, T.L.; KANABUS, J.; CARPITA, N.C. Fructan synthesis in wheat leaf blades. **Journal of Plant Physiology**, v. 134, p. 192-195, 1989.
- ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and developemnt in Japan. **Food Technology**, v. 47, p.126-135, 1993.
- JUNG, K.H.; KIM, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Production of high fructooligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose-oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 65-70, 1993.
- JUNG, G.H.; LIM, J.Y.; YOO, S.J.; LEE, J.H.; YOO, M.Y. Production of fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 703-708, 1987.
- JUNG, K.H.; YUN, J.W.; KANG, K.R.; LIM, J.Y.; LEE, J.H. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 11, p. 491-494, 1989.
- KOHOMOTO, T.;FUKUI, F.; TANAKA, H.; MITSUOKA, T. Dose-response test of isomalto-oligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2157-2159, 1991.
- LEE, K.J.; CHOL, J.D.; LIM, J.Y. Characterization of extracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans* C-23. **Korea Journal of Microbiology**, v. 29, p. 310-306, 1991.
- LEE, K.J.; CHOL, J.D.; LIM, J.Y. Purification and properties of intracellular fructosyl transferase from *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 411-415, 1992.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANLEY-HARRIS, M.; RICHARDS, G.N. Formation of trisaccharides (kestoses) by pyrolysis of sucrose. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 101-113, 1991.
- McKELLAR, R.C.; MODLER, H.W. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium sp.* **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 537-541, 1989.

- MENEZES, T.J.B. Como a genética pode auxiliar a indústria de fermentação. **Coletâneas ITAL**, v.19, p. 1-11, 1989.
- MODLER, H.W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. **International Dairy Journal**, v. 4, p. 383-407, 1994.
- MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; GOFF, H.D.; MACKIE, D. Using ice cream as a mechanism to incorporate bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, p. 3-9, 1990a.
- MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, v. 23, p. 29-41, 1990b.
- MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. The production of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium spp.* **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 1451-1454, 1992.
- MURAMATSU, K.; ONODERA, S.; KIKUCHI, M.; SHIOMI, N. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis G1*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1681-1685, 1993.
- MURAMATSU, M.; KAINUMA, S.; MIWA, T.; NAKAKUKI, T. Structures of some fructooligosaccharides produced from sucrose by mycelia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 1303-1304, 1988.
- NEVALAINEN, K.M.H. Induction isolation and characterization of *A. niger* mutants strains producing elevated levels of Beta-glucosidase. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, p. 593-596, 1981.
- NISHIZAWA, M.; MARUYAMA, Y.; NAKAMURA, M. Purification and characterization of invertase isozymes from *Fusarium oxysporum* **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 489-498, 1980.
- OHTSUKA, K.; HINO, S.; FUKUSHIMA, T.; OZAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683 **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 56, p. 1373-1377, 1992.
- OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a new sweetener "neosugar" in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1574-1581, 1984.

- OLIVEIRA, I.M.A. Produção e caracterização da β -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* e sua aplicação na produção de fructooligosacarídeos. Campinas, FEA/UNICAMP. 124p. (tese de doutorado) 1997.
- ONISHI, N.; YAMASHIRO, A.; YOKOZEKI, K. Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4022-4025, 1995.
- PARK, Y.K.; ALMEIDA, M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 331-334, 1991.
- PARK, Y.K. & SANTI, M.S.S. Induction of high amyloglicosidase-producing mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal Fermentation Technology**, v. 55, p. 193-195, 1977.
- PARK, Y.K.; YIM, D.K.; PASTORE, G.M. Conversion of sucrose by yeast β -fructofuranosidase. In: PROGRESS IN FOOD FERMENTATION, 1993, Valencia. **Proceeding of Seventh European Conference of Food Chemistry**. Valencia, 1993. p.223-228.
- PAZUR, J.H. Transfructosidation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 199, p. 217-225, 1952.
- PITTS, E. Dairy ingredients: new opportunities in functional foods. **The World of Ingredients**, p. 40-43, oct/nov, 1994.
- PSZCZOLA, D.E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. **Food Technology**, v. 42, p. 96-100, 1988.
- REESE, E.T.; BIRZGALIS, R.; MANDELS, F.W. Sucrases in fungi. **Canadian Journal of Biochemical Physiology**, v. 40, p. 272-283, 1962.
- SAUNDERS, R.M.; WALKER, H.G. The sugars of wheat bran. **Cereal Chemistry**, v. 46, p. 85-92, 1969.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Isolation and identification of fructooligosaccharides in roots of asparagus. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 567-575, 1976.
- SHIOMI, N.; YAMADA, J.; IZAWA, M. Synthesis of several fructooligosaccharides by asparagus fructosyl transferases. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, p. 2233-2244, 1979.

- SILVA, J.C. Seleção de *A. niger* para produção de ácidos. Campinas, IB/UNICAMP. 91p. (tese de mestrado) 1977.
- SPIEGEL, J.E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V.H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85-89, 1994.
- STRAATHOF, A.J.J.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM, H.V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, v. 146, p. 154-159, 1986.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (neosugar) on growth and gastrointestinal function of rat. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v. 32, p. 111-121, 1986.
- TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSOYA, N. Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharide (neosugar) in rats. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 553-559, 1989.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, p. 61-65, 1994.
- UHM, T.B.; JEON, D.Y.; BYUN, S.M.; HONG, J.S.; GROOTWASSINK J.W.D Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 926, p. 119-126, 1987.
- USAMI, S.; TAKASHI, I.; KIRIMURA, K.; UEHARA, K.; CHEN, J. Production of β -fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*). **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, p. 303-305, 1991.
- WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. **Biochemische Zeitschrift**, v. 310, p. 384-421, 1941.
- WENHAM, D.G.; HENNESSEY, T.D.; COLE, J.A. Regulations of glucosyl- and fructosyl transferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, p. 117-124, 1979.
- WHITAKER, J.K. Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker, Inc.. 1972.

- YAMASHITA, I. And FURKVI, S. Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 137-141, 1984.
- YASUDA, H.; SHITOH, T.; YAMANO, T.; ITOH, Y; SHIMURA, S. Identification of neokestose produced from sucrose by an enzyme of *Penicillium oxalicum* **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 777-778, 1986.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cell of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 2, p. 98-101, 1992a.
- YUN, J.W.; JUNG, K.H.; OH, J.W.; LEE, J.H. Semi batch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 24/25, p. 299-308, 1990.
- YUN, J.W.; KANG, S.C.; SONG, S.K. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase. **Biotechnology Techniques**, v. 9, p.805-808, 1995.
- YUN, J.W.; LEE, M.G.; SONG, S.K. Batch production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructofuranosidase and glucose oxidase. **Journal of Fermentation and Bioengineering** , v. 77, p. 159-163, 1994a.
- YUN, J.W.; LEE, M.G.; SONG, S.K. Continuous production of isomalto-oligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 1145-1150, 1994b.
- YUN, J.W.; OH, K.K.; KIM, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H. Production of palatinose by immobilized cells of *Erwinia raphontici*. **Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 7, p. 79-83, 1992b.
- YUN, J.W.; SONG, S. K. The production os high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 573-576, 1993.