

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS DE GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp. D-12.
PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DE SACAROSE.

Érica Marcondes Celestino
Farmacêutica-Bioquímica

PARECER

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

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ERICA MARCONDES CELESTINO Aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de dezembro de 1998.

Campinas, 02 de dezembro de 1998

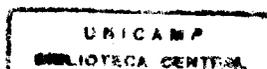
Hélia Harumi Sato

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS – SP – BRASIL

Dezembro – 1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
T. Nº BC/	36439
PROC	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/02/99
N.º CPD	

CM-00120545-3

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

C33p

Celestino, Érica Marcondes

Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D-12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose. / Érica Marcondes Celestino. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Hélia Harumi Sato

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

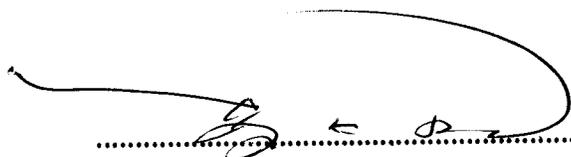
1. Glicosiltransferase. 2. Isomaltulose. 3. Palatinose. 4. *Erwinia* sp. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA


.....

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora


.....

Prof. Dr. Yong Kun Park

Membro


.....

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Membro

.....

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Membro

Campinas, de dezembro de 1998.

**Aos meus pais Antonio e Luci, minhas irmãs,
meu marido Paulo e minha filha Catharina,
pelo amor, conforto, paciência e compreensão
em todos os momentos,**

Dedico.

À PROFESSORA HÉLIA

Agradeço por todos estes anos que trabalhamos juntas, sua amizade, sua dedicação, sua paciência sem limites, sua compreensão, seu apoio, sua competência e dedicação à profissão, seu exemplo, dia após dia, de um modo de ser muito especial, iluminado e maduro que me fez repensar meu próprio modo de viver e conviver.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cesar Francisco Ciacco, que me ajudou a encontrar, no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos, uma forma de me aperfeiçoar como profissional.

À Profa. Gláucia Maria Pastore que foi quem eu conheci primeiro e me recebeu muito bem.

Ao Prof. Yong Kun Park por ter me aceitado como estagiária em seu Laboratório e também por me apresentar a Profa. Dra. Hélia Harumi Sato.

Aos Professores e aos funcionários dos vários Departamentos da FEA pela ajuda direta ou indireta durante a realização desta tese.

Ao Marcolino pela força, amizade e incentivo, desde o primeiro dia em que entrei no Laboratório de Bioquímica.

Aos amigos Regina, Patrícia, Roseli, Marjorie, Márcia, Gabriela, Enilene, Maricy, Dong, Contado, Masaharu, Argentina, Eliane, Michel, Elisa, Carlos, Cristina, Marina, Letécia, Angelita, Heinz, Ila Maria, Lilian, Zé Carlos, Edilsa, Cristian, Romildo (*in memoriam*).

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Dora, Paulo, Beatriz e Leonor pela amizade e apoio.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e da Secretaria de Pós-Graduação.

Ao Marquinhos da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos pela constante colaboração.

À CAPES e FAPESP pelas bolsas concedidas que possibilitaram a materialização deste projeto.

Aqueles que cujos nomes não foram citados mas que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

INDICE GERAL

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Microrganismos produtores de glicosiltransferase e capazes de converter sacarose em isomaltulose.....	2
2.2. Isomaltulose - Características e Aplicações.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Equipamentos.....	19
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose.....	19
3.2.1.1. Coleta de amostra para isolamento de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose.....	19
3.2.1.2. Isolamento de microrganismos.....	20
3.2.1.3. Seleção de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose.....	20

3.2.1.4. Cromatografia de açúcares em papel.....	20
3.2.1.5. Determinação da atividade enzimática de glicosiltransferase.....	21
3.2.2. Identificação da linhagem produtora de glicosiltransferase.....	21
3.2.3. Estudo da produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12 em diferentes meios de cultura.....	22
3.2.3.1. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante do meio de cultura.....	23
3.2.3.2. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada.....	23
3.2.4. Efeito da concentração de sacarose e peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12.....	24
3.2.4.1. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12.....	24
3.2.4.1.1. Determinação da massa celular seca.....	24
3.2.4.1.2. Extração da glicosiltransferase intracelular da linhagem D-12.....	25
3.2.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12.....	25
3.2.5. Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de enzima a 28°C, 30°C e 35°C.....	25
3.2.5.1. Preparação do inóculo.....	26
3.2.5.2. Fermentação.....	26
3.2.5.3. Determinação do Crescimento do Microrganismo.....	26
3.2.6. Produção e Purificação da Glicosiltransferase.....	27
3.2.6.1. Produção da Glicosiltransferase.....	27
3.2.6.2. Purificação da Glicosiltransferase.....	27
3.2.6.2.1. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	27
3.2.6.2.2. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.....	28
3.2.7. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada da linhagem D-12.....	28
3.2.7.1. Efeito da Concentração do Substrato na Atividade Enzimática.....	29
3.2.7.2. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	29
3.2.7.3. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima Purificada.....	29
3.2.7.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	30
3.2.7.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade Enzimática.....	30
3.2.7.6. Efeito de Sais Minerais e outros Compostos Inorgânicos na Atividade da Glicosiltransferase.....	30
3.2.7.7. Efeito de Inibidores na Atividade da Glicosiltransferase.....	31

3.2.7.8. Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase da Linhagem D-12.....	31
3.2.8. Aplicação da glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de sacarose.....	32
3.2.8.1. Efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose.....	32
3.2.8.2. Aplicação da glicosiltransferase da linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de solução 5% e 10% de sacarose a 40°C.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de glicosiltransferase.....	33
4.2. Identificação da linhagem produtora de glicosiltransferase.....	34
4.3. Produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12 em diferentes meios de cultura.....	35
4.4. Efeito da concentração de sacarose e peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	36
4.4.1. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	36
4.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	37
4.5. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 28°C, 30°C e 35°C.....	38
4.6. Produção e purificação da Glicosiltransferase.....	42
4.6.1. Produção da glicosiltransferase.....	42
4.6.2. Purificação da Glicosiltransferase.....	43

4.7. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada Obtida da Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	46
4.7.1. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática.....	46
4.7.2. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	47
4.7.3. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima Purificada.....	48
4.7.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	49
4.7.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade Enzimática.....	50
4.7.6. Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade da Glicosiltransferase.....	51
4.7.7. Efeito de Inibidores na Atividade da Glicosiltransferase.....	53
4.7.8. Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase da Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	55
4.8. Aplicação da glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de sacarose.....	56
4.8.1. Efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose.....	56
4.8.2. Aplicação da glicosiltransferase a linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de de sacarose a 40°C.....	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. SUGESTÕES PARA O PRÓXIMO TRABALHO.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8. ANEXO.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Composição dos Meios de Cultura.....	22
TABELA 2 – Características Morfológicas, Bioquímicas e Fisiológicas da Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	34
TABELA 3 – Produção de Glicosiltransferase pela Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12 em Diferentes Meios de Cultura.....	36
TABELA 4 - Efeito da Concentração de Sacarose no Meio de Cultura na Produção de Glicosiltransferase pela Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	37
TABELA 5 - Efeito da Concentração de Peptona no Meio de Cultura na Produção de Glicosiltransferase pela Linhagem <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	38
TABELA 6 – Purificação de Glicosiltransferase Intracelular de <i>Erwinia</i> sp. D-12.....	45
TABELA 7 - Efeito de Sais Minerais na Atividade de Glicosiltransferase sobre o Substrato Sacarose.....	52
TABELA 8 – Efeito de Inibidores na Atividade de Glicosiltransferase sobre a Sacarose.....	53
TABELA 9 – Conversão de Sacarose em Isomaltulose pela Glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D-12 a 40°C.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase da linhagem D-12.....	33
FIGURA 2 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Glicosiltransferase a 28°C.....	39
FIGURA 3 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Glicosiltransferase a 30°C.....	40
FIGURA 4 - Estudo da relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Glicosiltransferase a 35°C.....	41
FIGURA 5 - Cromatografia de Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50.....	43
FIGURA 6 - Cromatografia de Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sepharose CL-6B.....	44
FIGURA 7 - Efeito da Concentração do Substrato Sacarose na Atividade de Glicosiltransferase.....	46
FIGURA 8 - Efeito do pH na Atividade de Enzimática.....	47
FIGURA 9 - Efeito do pH na Estabilidade da Enzima Purificada.....	48
FIGURA 10 - Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	49
FIGURA 11 - Efeito da Temperatura na Estabilidade Térmica.....	50
FIGURA 12 – Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp. D-12 Através de Filtração em Gel Sephadex G-200.....	55
FIGURA 13 – Efeito da Temperatura na Conversão de Solução 5% de Sacarose em Isomaltulose pela Glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12.....	57

RESUMO

Trezentas e quatorze linhagens de microrganismos foram isoladas de amostras de mel, flores, frutas, caldo, melaço e mosto de usina de álcool e açúcar e testadas quanto a capacidade de produção de glicosiltransferase, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose (6-O- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose). A isomaltulose também conhecida como palatinose apresenta baixo potencial cariogênico e tem sido utilizada na produção de balas, gomas de mascar e produtos de confeitaria.

A linhagem D-12 produtora de glicosiltransferase foi selecionada e identificada como *Erwinia* sp. pelas características morfológicas e bioquímicas.

Estudou-se a produção, purificação e a caracterização bioquímica da glicosiltransferase intracelular da linhagem de *Erwinia* sp. D-12. No estudo da produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12, em meio de cultura composto de 6% de sacarose, 6% de peptona e 0,4% de extrato de carne, em fermentador de 2L verificou-se que a enzima é produzida na fase exponencial de crescimento, sendo que a produção máxima foi obtida após 3 horas de fermentação a 28°C e, após 4 horas de incubação a 30°C e 35°C. A enzima foi purificada através da cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e DEAE-Sepharose CL-6B. A glicosiltransferase purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C. A glicosiltransferase purificada de *Erwinia* sp. D-12 é termosensível sendo inativada após 1 hora de tratamento a temperaturas superiores a 39°C e após 3 horas a 35°C na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3 após 24 horas de incubação a 5°C. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima purificada foram respectivamente, 138mM de sacarose e 9,81 μ mol de isomaltulose/minuto/mg de proteína.

A atividade de glicosiltransferase não foi afetada por KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, Na₂HAsO₄ na concentração 10mM, em relação ao volume final da mistura de reação, enquanto que os sais de CoCl₂, ZnCl₂, FeCl₃ e CuSO₄ não afetaram sua atividade nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM. Os sais MnCl₂ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração de 0,1mM não inibiram a atividade de glicosiltransferase. A atividade residual de glicosiltransferase na presença de MnCl₂, nas concentrações 1mM e 10mM, foi respectivamente 93,0% e 73,7% enquanto que na presença

de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, nestas concentrações, a atividade residual foi 98,3% e 93,3%. O sal BaCl_2 não inibiu a atividade da glicosiltransferase na concentração de 0,1mM. O sal AgNO_3 inibiu cerca de 37% a atividade de glicosiltransferase na concentração de 0,1mM e inibiu completamente na concentração 1,0mM enquanto que o HgCl_2 inibiu completamente a enzima na concentração 1mM em relação ao volume final de reação.

Os reagentes ácido etilenodiaminotetracético e L-cisteína nas concentrações 0,1mM, 1,0mM e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação não inibiram a atividade de glicosiltransferase. A atividade de glicosiltransferase não foi inibida pelos reagentes azida de sódio e dietilditiocarbamato de sódio nas concentrações 0,1mM e 1,0mM. O reagente p-cloromercuribenzoato inibiu a atividade de glicosiltransferase nas concentrações 0,1mM e 1,0mM e a atividade residual na presença do inibidor foram respectivamente 79,8% e 60,7%. O reagente N-bromosuccinimida inibiu cerca de 6% a atividade de glicosiltransferase na concentração 0,1mM e inibiu completamente a enzima na concentração 1,0mM. A iodoacetamida inibiu a atividade de glicosiltransferase na concentração final 1,0mM e 10,0mM e a atividade na presença do inibidor foram respectivamente 65,5% e 21,3%.

O peso molecular da glicosiltransferase purificada da linhagem *Erwinia* sp. D-12 foi estimado em 63.000 daltons através da filtração em gel Sephadex G -200.

No estudo da aplicação da glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 na conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se solução 5% e 10% de sacarose foram obtidos rendimento de 73,5% e 72,3% de isomaltulose respectivamente, após 4 horas de reação a 40°C.

SUMMARY

Three hundred and fourteen strains of microorganisms were isolated from honey, flowers, fruit, sugar cane juice, sugar cane molasses and must samples obtained from alcohol and sugar producing plants and examined for their capacity to produce glucosyltransferase, which converts sucrose to isomaltulose (6-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose). Isomaltulose, also known as palatinose, has low cariogenic activity and has been used in the production of candies, chewing gums and confectionary products.

The glucosyltransferase producing strain was selected and identified as *Erwinia* sp. according to its morphological and biochemical characteristics.

The production, purification and biochemical characterization of intracellular glucosyltransferase from the strain *Erwinia* sp. D-12 was studied.

The production of glucosyltransferase was performed in a 2L jar fermentor using the following medium: 6% sucrose, 6% peptone and 0.4% meat extract. It was shown that the enzyme was produced during the exponential growth phase and maximum activity was verified after three hours of fermentation at 28°C or after 4 hours fermentation at 30°C or 35°C.

The enzyme was purified by DEAE-Sephadex A-50 and DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography. The purified glucosyltransferase showed optimum activity at pH 6.0 and 40°C. The purified glucosyltransferase is thermosensitive and was inactivated after one hour of treatment at temperatures above 39°C or after 3 hours at 35°C in the absence of substrate. The enzyme was stable between pH 5.7 and pH 6.3 after 24 hours incubation at 5°C. The kinetic parameters K_m and V_{max} with respect to sucrose were 138mM and 9.81 μ mol of isomaltulose/minute/mg protein respectively. The glucosyltransferase activity was not affected by KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, NaHAsO₄ at concentrations of 10mM with respect to the final volume of the reaction mixture while the salts CoCl₂, ZnCl₂, FeCl₃ and CuSO₄ did not affect its activity at concentrations of 0.1mM and 10mM. The salts MnCl₂ and Pb(CH₃COO)₂ did not inhibit glucosyltransferase activity at a concentration of 0.1mM. The residual activity of glucosyltransferase in the presence of 1mM and 10mM MnCl₂ was respectively 93.0 and 73.7%,

whereas in the presence of $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ at the same concentrations it was 98.3 and 93.3%. The salt BaCl_2 did not inhibit glucosyltransferase activity at a concentration of 0.1mM. The salt AgNO_3 inhibited about 37% of the glucosyltransferase activity at a concentration of 0.1mM and completely inhibited it at a concentration of 1.0mM. The salt HgCl_2 completely inhibited the enzyme activity at a concentration of 1 mM with respect to the final volume of the reaction mixture.

Ethylenediaminetetraacetic acid and L-cystein at concentrations of 0.1, 1.0 and 10mM with the respect to the final volume of the reaction mixture did not inhibit glucosyltransferase activity. The enzyme was not inhibited by sodium azide or sodium diethyldithiocarbamate at concentrations of 0.1 and 1.0mM. The p-chloromercuribenzoate reagent at concentrations of 0.1mM and 1.0mM inhibited glucosyltransferase activity, resulting in residual activity of 79.8 and 60.7% respectively. The N-bromosuccinimide reagent inhibited about 6% of the glucosyltransferase activity at a concentration of 0.1mM and completely inhibited it at a concentration of 1.0mM. Iodoacetamide inhibited glucosyltransferase activity at concentrations of 1.0 and 10.0 mM, resulting in residual activity of 65.5 and 21.3% respectively.

The molecular weight of purified glucosyltransferase was determined as being 63.000 daltons by Sephadex G-200 gel filtration.

The application of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D-12 in the conversion of sucrose to isomaltulose was studied using 5 and 10% sucrose solutions, giving yields of 73.5 and 72.3% after 4 hours of reaction at 40°C.

1- INTRODUÇÃO

A produção de açúcares alternativos tem grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica. A isomaltulose, 6- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose é um açúcar redutor que ocorre naturalmente em mel e caldo de cana e é produzido industrialmente a partir de sacarose por conversão enzimática da ligação glicosil de (1 \rightarrow 2) frutose para (1 \rightarrow 6) frutose. A isomaltulose é comercializada como Lylose (Tate & Lyle, Reading, England) e Palatinose (Mitsui Sugar Company, Tokyo, Japan). Devido ao baixo potencial cariogênico e propriedades físicas e organolépticas bastante similares a sacarose, este açúcar tem sido utilizado comercialmente no Japão na produção de balas, gomas de mascar e confeitos (NEWBRUN,1991).

Este açúcar também pode ser empregado como matéria-prima na produção do açúcar-álcool o isomalte [α -D-glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + α -D-glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)] que apresenta baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixa higroscopicidade em relação a outros açúcares álcoois tais como sorbitol, manitol e xilitol.

Os principais microrganismos produtores de glicosiltransferase, descritos da literatura, capazes de converter sacarose em palatinose com alto rendimento são *Protaminobacter rubrum* (MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, citado por McALLISTER et alii, 1990), *Erwinia rhapontici* (CHEETHAN et alii, 1982b e 1985), *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (LUND & WYATT, 1973) e, *Serratia plymuthica* (MAUCH & SCHMIDT-BERG- LORENZ, citado por McALLISTER et alii, 1990); FUJI et alii, 1983; McALLISTER et alii, 1990)

O presente trabalho visou o isolamento e seleção de microrganismo capaz de converter sacarose com alto rendimento; estudo da produção, purificação, caracterização bioquímica da glicosiltransferase microbiana da linhagem selecionada *Erwinia* sp. D-12, e o estudo da aplicação da enzima na conversão de sacarose em isomaltulose.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

Em 1952, STODOLA et alii, durante o estudo da formação de dextrana a partir de sacarose, usando a dextranasacarase obtida pela fermentação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, isolaram dois novos açúcares como subprodutos da reação. Um deles foi identificado como sendo o dissacarídeo leucrose (5-o- α -D-glicopiranosil D-frutose). Posteriormente, o outro açúcar foi identificado como isomaltulose (6-0- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose) por SHARPE et alii (1954) (citado por SHARPE et alii, 1960). Este dissacarídeo podia ser facilmente distinguido da isomaltose (6-o- α -D-glicopiranosil-D-glicose) através de cromatografia em papel. A sua forma fenilosotriazólica era idêntica àquela obtida com isomaltose, estabelecendo desse modo a sua estrutura como isomaltulose.

Posteriormente, STODOLA et alii (1956) relataram que a isomaltulose foi isolada como subproduto durante o processo de obtenção do dissacarídeo leucrose a partir de sacarose por ação da dextranasacarase (sacarose: 1,6- α -D-glucana 6- α -D-glicosiltransferase E.C. 2.4.1.5) produzida pelo microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

A conversão de sacarose em isomaltulose, com alto rendimento, foi descrita pela primeira vez, em 1957, por WEIDENHAGEN & LORENZ (citado por SHARPE et alii, 1960a). Os autores relataram a conversão de 90% da sacarose em isomaltulose, durante um processo fermentativo, por ação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*. O produto foi denominado palatinose.

AVIGAD (1959) descreveu a síntese de glicosilfrutoses pela ação de α -glicosidase obtida de levedura, em mistura de reação contendo 17,1% de sacarose e 18,0% de frutose em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,6, no qual também se adicionou invertase para a hidrólise total dos

resíduos de sacarose. Após a remoção de hexoses livres, os oligossacarídeos foram purificados e analisados. Foram obtidos seis tipos de glicosilfrutoses, sendo que o dissacarídeo isomaltulose foi o produto formado em maior quantidade. Na cromatografia dos açúcares em papel, a isomaltulose apresentou coloração amarelo-oliva após revelação com anilina-difenilamina.

SHARPE et alii (1960) descreveram a obtenção e estudo de algumas propriedades da isomaltulose formada durante a síntese enzimática de dextrana por ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Na cromatografia de açúcares em papel, quando revelada com o reagente uréia-ácido fosfórico, a isomaltulose apresentou uma coloração característica de dissacarídeos formados de frutose e quando foi hidrolisada por aquecimento por 1 hora em HCL 0,5N, a cromatografia em papel do hidrolisado mostrou quantidades equivalentes de glicose e frutose.

BOURNE et alii (1961) verificaram que durante a fermentação de *Streptococcus bovis* em meio contendo 8,5% de sacarose, paralelamente à produção de dextrana, havia produção de diversos oligossacarídeos, tais como isomalte, isomaltotriose, 5- α -isomaltosil-D-frutose, isomaltotriulose, sendo que leucrose e isomaltulose eram produzidos em grande quantidade.

MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ (1964a e 1964b) citado por McALLISTER et alii (1990) estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* e *Protaminobacter rubrum* e sugeriram que a enzima envolvida era uma isomaltulose transglicosilase porque além da formação de isomaltulose, a enzima catalisava a transferência de resíduos α -D-glicosil. Na presença de sacarose, manose ou arabinose havia formação de isomaltulose, α -D-glicosil-manose ou α -D-glicosil-arabinose. Os autores verificaram que a enzima de *Protaminobacter rubrum* que catalisava a síntese de isomaltulose a partir de sacarose era intracelular.

LUND & WYATT (1973) relataram que durante a fermentação de *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* G-120 em meio contendo 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 4% de sacarose a 25°C durante 3 dias sob agitação havia a formação de dois compostos redutores, denominados I e II. Após cromatografia em papel dos compostos purificados e revelação com anilina-difenilamina-ácido fosfórico, o componente I e o açúcar padrão palatinose, apresentaram

coloração verde-amarelada, característica de oligossacarídeos que apresentam ligação glicosídica α -1,6. Após a hidrólise ácida do componente I com ácido sulfúrico 0,5N durante 2 horas e análise dos produtos de hidrólise através de cromatografia em papel, os autores verificaram que havia formação de glicose e frutose em quantidades aproximadamente iguais.

KOBAYASHI & MATSUDA (1980) verificaram que a dextranasacarase ou glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que catalisa a síntese de dextrana a partir de sacarose, foi ativada 11% por CaCl_2 (1,0mM) e inibida pelos sais de CuCl_2 , FeCl_3 e MnCl_2 na concentração de 1,0mM. A enzima foi inibida por EDTA (0,5 mM) e não sofreu ativação na presença dos reagentes p-cloromercuribenzoato e L-cisteína na concentração 1 mM.

CHEETHAN et alii (1982b) descreveram a bioconversão de sacarose para isomaltulose pela bactéria *Erwinia rhapsontici*. A enzima que catalisava a formação de isomaltulose era uma glicosiltransferase e estava localizada no espaço periplásmico. Esta enzima era mais ativa em pH 7,0 e a 30°C e apresentava valor de K_m em relação ao substrato sacarose igual a 0,35M. Os autores verificaram a formação de ácidos e de um dissacarídeo possivelmente 1-0- α -D-glicosilfrutose como subprodutos durante a fermentação da sacarose.

Pesquisadores da Companhia Mitsui Sugar (citado por FUJI et alii, 1983) desenvolveram um método de produção industrial de palatinose à partir de sacarose empregando células de *Serratia plymuthica* NCIB 8285. Neste processo eram também formados outros oligossacarídeos em pequenas quantidades, além da palatinose.

FUJI et alii (1983) descreveram a caracterização dos oligossacarídeos produzidos a partir de sacarose por ação da glicosiltransferase da bactéria *Serratia plymuthica* NCIB 8285. Após remoção da maior parte da palatinose da mistura de reação, os autores verificaram através de HPLC que a solução de açúcar residual consistia de 15,9% de frutose, 9,7% de glicose, 21,8% de sacarose, 16,6% (1 α -D-glicopiranosil-D frutofuranose), 21,8% de palatinose, 5,2% de isomaltose, 8,2% de isomelezitose. A partir da identificação dos oligossacarídeos, os autores concluíram que a enzima catalisava a transferência de resíduos glicosil para o grupo OH do C_1 e C_6 da molécula de frutose ou para o grupo OH do C_6 da molécula de glicose.

CHEETHAN et alii (1985) relataram a produção de isomaltulose a partir de solução 55% de sacarose, utilizando células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas. A conversão máxima da sacarose para palatinose (90%) ocorreu quando o substrato foi ajustado para pH 7,0 com NaOH 0,1M e a 30°C. Foi observado que além de isomaltulose, havia também a formação de subprodutos, embora em pequenas quantidades, principalmente de trealulose (α -D-glicopiranosil- α -D-frutofuranosídeo).

McALLISTER et alii (1990) descreveram a produção e purificação de enzima intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, capaz de converter sacarose em isomaltulose. A produção máxima da enzima intracelular ocorreu após 16 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 40g de sacarose, 10g de peptona e 4,0g de extrato Lab-Lemco por litro. A preparação da enzima bruta foi obtida pelo rompimento da massa celular com Prensa X, tratamento com sulfato de estreptomicina para remoção de ácidos nucleicos, diálise e ultrafiltração. A enzima glicosiltransferase foi purificada 25 vezes através de cromatografia em coluna de CM-Bio Gel A. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 30°C. O valor de Km para o substrato sacarose foi igual a 65,3 mM. O peso molecular da enzima foi estimado em 79.500 daltons. Os autores obtiveram um rendimento de 85,58% e 84,97% de isomaltulose a partir de soluções 5% e 10% de sacarose, respectivamente, após uma hora de reação a 30°C utilizando a glicosiltransferase. Os autores relataram que existem dois tipos de enzimas produtoras de isomaltulose. A primeira dextranasacarase, produz isomaltulose como subproduto durante a formação de dextrana, como é o caso da enzima de *Leuconostoc mesenteroides* e a segunda produz isomaltulose como produto principal da sua ação sobre a sacarose, como é o caso da enzima intracelular de *Serratia plymuthica*.

MIYATA et alii (1992) isolaram um microrganismo identificado como *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, produtor de glicosiltransferase capaz de converter sacarose em trealulose. Os autores verificaram a presença de trealulose, glicose, frutose, sacarose e isomaltulose no sobrenadante do meio de cultura de através de HPLC. Foi observado que a isomaltulose era produzida concomitante com a trealulose e, a partir do momento que toda a sacarose, disponível no meio era convertida, a proporção entre trealulose e isomaltulose decrescia

gradativamente, ou seja, a trealulose presente no meio era consumida preferencialmente pelo microrganismo mais do que a isomaltulose. Relataram ainda que os diversos microrganismos produtores de trealulose e isomaltulose, geraram, principalmente, isomaltulose com um rendimento geralmente acima de 80%.

TSUYUKI et alii (1992) isolaram linhagens de *Klebsiella planticola* e *Klebsiella terrigena*, a partir de amostras do solo da Tailândia, que produziam isomaltulose e trealulose a partir de sacarose. Na conversão de sacarose pela α -glicosiltransferase da linhagem *Klebsiella planticola* MX-10, os autores obtiveram 65% de isomaltulose e 30% de trealulose.

PARK et alii, 1992, descreveram o isolamento de linhagem de *Klebsiella* sp produtora de glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose. A enzima apresentava atividade ótima em pH 6-6,5 e 35°C. Foi verificado que os íons metálicos Hg^{+2} e Ag^{+} inibiam totalmente a enzima na concentração de 1mM enquanto que o EDTA na concentração de 10mM inativava ligeiramente a enzima. O reagente p-cloromercuribenzoato, na concentração de 0.01-0,1mM, não inibiu a atividade da enzima. A glicosiltransferase apresentou valor de K_m 120mM para o substrato sacarose e a velocidade máxima de 110 μ g palatinose por minuto por mL. Os autores obtiveram 86% de conversão máxima da sacarose em isomaltulose a 25°C.

UEKANE (1993) descreveu a produção e caracterização bioquímica de glicosiltransferase da linhagem de *Klebsiella* sp. n°18 capaz de converter sacarose em isomaltulose. A autora verificou que na fermentação de *Klebsiella* sp. n°18 em meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne a 30°C, a glicosiltransferase intracelular foi produzida na fase exponencial de crescimento, atingindo a atividade máxima de 0,167 unidades/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação permanecendo constante até 32 horas aproximadamente. Após este período, foi observado diminuição da atividade intracelular, sendo que após 80 horas de fermentação, a atividade foi de aproximadamente 0,097 unidades/ml de meio de cultura. Na fermentação a 36°C a produção de glicosiltransferase intracelular alcançou atividade máxima de 0,082 unidades/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação diminuindo rapidamente após 32 horas de fermentação. A preparação bruta de glicosiltransferase intracelular obtida através de oscilação ultrasônica da suspensão da massa celular apresentou

2,95 unidades/ml e atividade específica 0,014 unidades/mg de proteína. A enzima foi purificada 12,1 vezes após fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose. A enzima purificada apresentou 0,17 unidades de atividade/mg de proteína. A enzima glicosiltransferase da linhagem de *Klebsiella* sp. n°18 apresentou atividade ótima em pH 6,0 a 35°C e mostrou-se estável na faixa de pH5,5 a 6,6 em tampão citrato-fosfato sendo inativada em pH inferiores a 4,6 após 24 horas de incubação a 5°C. A enzima mostrou-se termosensível sendo inativada rapidamente em temperaturas superiores a 30°C após 3 horas de incubação na ausência de substrato. A autora relatou que os sais CuSO₄, KCl, MgSO₄, FeCl₃ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração 1,0mM não afetaram a atividade de glicosiltransferase. Os sais MnCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, BaCl₂, CoCl₂ na concentração 1 mM inibiram levemente a atividade de glicosiltransferase e, os sais HgCl₂ e AgNO₃ inibiram completamente a atividade da enzima. A glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18 não foi afetada na presença de p-cloromercuribenzoato na concentração 0,01mM e 0,1mM e iodoacetamida na concentração de 10mM, sugerindo desta forma, a ausência de grupos sulfidrílicos essenciais para a atividade catalítica desta enzima. Da mesma forma, a atividade de glicosiltransferase não foi influenciada pelos reagentes azida de sódio, dietilditiocarbamato de sódio e L-cisteína nas concentrações de 0,1mM, 1,0mM e 10mM. O reagente ácido etilenodiaminotetracético na concentração 10mM em relação ao volume final de reação inibiu 20% da atividade da glicosiltransferase. A conversão máxima de sacarose em palatinose foi 86% quando a glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18 foi incubada com solução contendo 4% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,5 a 25°C por 64 horas.

NAGAI-MIYATA et alii, em 1993, relataram que a produção máxima de α -glicosiltransferase pela linhagem *Agrobacterium radiobacter* MX-232, que converte sacarose principalmente em trealulose, foi obtida após 60 horas de fermentação em meio composto de 0,1% de extrato de carne, 1% de peptona, 0,3% de NaCl, 0,1% de extrato LabLemco e 6% de melação ajustado a pH7,0. Os autores descreveram a produção de trealulose a partir da sacarose usando células imobilizadas de *Agrobacterium radiobacter*. A glicosiltransferase produzida pelo microorganismo convertia sacarose em trealulose e isomaltulose. Quando suspensões de células de *Agrobacterium radiobacter* e solução 20% de sacarose foram usadas na reação foi obtido 88-

90% (p/p) de rendimento de trealulose e com células imobilizadas, o rendimento foi cerca de 85% de trealulose a partir de solução 40-50% de sacarose (p/p).

REMAUD-SIMEON et alii (1994) descreveram a produção e a purificação de duas preparações enzimáticas com atividade de glicosiltransferase, a partir da cultura de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. A glicosiltransferase foi utilizada para produção de glicooligossacarídeos pela transferência de unidades glicosil da sacarose para a maltose.

HAYASHI et alii (1994) descreveram a purificação e propriedades de uma glicosiltransferase de *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 que catalisa a síntese de panose (glic α 1 \rightarrow 6glic α \rightarrow 4glic) e isomaltose (glic α 1 \rightarrow 6glic) a partir de maltose. A enzima foi purificada 58,25 vezes após fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-Celulofine A-800, S-Sepharose e Sephadex G200 com 21,5% de rendimento. A enzima apresentou atividade ótima em pH 4,5-5,5 e a 65°C. A glicosiltransferase mostrou-se estável na faixa de pH 4,0-6,0. A enzima reteve 96% da atividade após 15 minutos de tratamento a 60°C. A atividade da enzima foi fortemente inibida por Hg²⁺, Ag⁺, Al³⁺ e Cu²⁺ na concentração 1mM. A enzima foi inibida por ácido nitriloacético, ácido monoiodoacético e arsenato de sódio.

NAGAI et alii (1994) purificaram a α -glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 que converte sacarose em trealulose e isomaltulose simultaneamente. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,8 e a 40°C e mostrou-se estável na faixa de pH 5,1 a 6,7 e em temperaturas inferiores a 40°C. Os autores verificaram que esta α -glicosiltransferase catalisava a produção de ambos os produtos e que a medida em que a concentração do substrato diminuía, a reação se tornava gradativamente mais lenta.

2.2- Isomaltulose: Características e Aplicações

A isomaltulose é um carboidrato naturalmente encontrado no mel em quantidade aproximada de 1% (SIDDIQUI & FURGALA, 1967). De acordo com LOW et alii (1988 a,b) a isomaltulose está presente no mel junto com outros oligossacarídeos.

A isomaltulose é hidrolisada por um sistema de enzimas em tecidos animais. DAHLQVIST et alii (1961) utilizando homogeneizados da mucosa intestinal de porcos verificaram que este açúcar é hidrolisado por um sistema de enzimas composto de 3 α -glucosidases distintas denominadas isomaltase específica, maltase II e maltase III sendo esta responsável por 50% da atividade total da palatinase deste homogeneizado bruto. Os autores verificaram que o pH ótimo da atividade palatinase estava entre 6.0 e 6.5. As três enzimas também hidrolisavam isomaltose (6-0- α -D-glicopiranosil-D-glicose) porém, em velocidade diferente da hidrólise da palatinose (6-0- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose).

DAHLQVIST et alii (1963) estudaram as enzimas do intestino humano envolvidas na hidrólise de dissacarídeos e a intolerância hereditária aos dissacarídeos sacarose, isomaltose, palatinose e isomaltooligossacarídeos (α -1,6 oligossacarídeos). Os autores verificaram que a hidrólise da palatinose parece ser catalisada somente pela isomaltase e a intolerância de alguns indivíduos à palatinose era devido a falta da isomaltase intestinal e sugeriram o uso da palatinose em testes de tolerância clínica para se averiguar a deficiência intestinal da isomaltase.

SCHIWECK et alii (1974) descreveram um processo de obtenção de isomaltitol (6-0- α -D-glicopiranosídeo -D-glucitol), um adoçante dietético, a partir de isomaltulose. No processo a isomaltulose foi obtida pela conversão enzimática de uma solução de 20 a 25% de sacarose na faixa de temperatura entre 20° a 37°C, sob agitação e aeração utilizando células de *Protaminobacter rubrum* ou de *Serratia plymuthica*. A conversão de sacarose à palatinose foi verificada no máximo de 12 horas, onde mais de 90% da sacarose empregada foi convertida a isomaltulose. Em seguida a isomaltulose foi hidrogenada em uma mistura-tampão alcalina, com hidrogênio, na presença de um catalisador para formação de isomaltitol descrito como isomaltita.

ROBERTS & HAYES (1980) verificaram que a palatinose era fracamente metabolizada por *Streptococcus mutans* e por microrganismos obtidos de placas dentárias e sugeriram que a palatinose era fracamente cariogênica.

SCHIWECK et alii (1980), publicaram um processo de produção de glicopiranosídeo-1,6-manitol, um adoçante dietético, por redução da isomaltulose. Este processo compreende a hidrogenação da isomaltulose, em solução aquosa neutra, na presença de um catalisador. A

mistura de reação é submetida a uma pressão de hidrogênio de cerca de 100kg/cm² numa temperatura de aproximadamente 120°C, durante cerca de 3 horas; em seguida a solução hidrogenada é resfriada numa taxa de 0,5-2°C/hora sob agitação constante até atingir 30°C, produzindo assim, o glicopiranosídeo-1,6-manitol na sua forma cristalina que poderá então, ser empregado em alimentos e bebidas.

BUCKE et alii (1981a, 1982), relataram processos de produção de isomaltulose a partir de sacarose. No processo descrito em 1981, as células íntegras de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 foram imobilizadas em gel de alginato. A partir de solução 40% de sacarose (p/v) foi obtido rendimento de 70 a 95% de isomaltulose. Na etapa seguinte, a isomaltulose era purificada através da cristalização. O produto purificado apresentava 90% ou mais de isomaltulose. Posteriormente, em 1982, os autores descreveram um processo para a produção de isomaltulose utilizando imobilização da célula íntegra ou rompida de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578, em gel de alginato de cálcio. Neste processo foi utilizado solução contendo pelo menos 40% (p/v) de sacarose ajustado para pH 5-9 e temperatura de 15-40°C. A amostra era reciclada na coluna por um período de tempo suficiente para permitir a conversão de 80-90% de substrato sacarose a isomaltulose. Os autores (1981b) descreveram a aplicação da isomaltulose, como um substituinte total ou parcial da sacarose, na composição de produtos para consumo humano como balas, doces, bolos, massas, geléias, sorvetes, frutas enlatadas, bebidas e também produtos farmacêuticos administrados oralmente.

TAKAZOE et alii (1982a), descreveram uma preparação de adoçante de baixa cariogenicidade, composto de 20-35 partes de palatinose por 100 partes de sacarose (p/p), para ser aplicado em alimentos e bebidas.

SHIMIZU et alii (1982b), descreveram um processo industrial de imobilização da α -glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 útil na produção de palatinose a partir de sacarose, onde as células da bactéria, que contém a enzima, são granuladas para apresentarem um diâmetro na faixa de 1-3mm e, imobilizadas em gel de alginato de cálcio, seguida pela imersão em solução de polietilenoimina neutralizada e do tratamento com uma solução de glutaraldeído. A enzima assim imobilizada foi empacotada numa coluna e uma solução de sacarose era

continuamente reciclada através da coluna. Neste processo em que a temperatura não ultrapassava 30°C, o pH da mistura de reação era ajustado fora da coluna e mantido numa faixa de 5,0-5,8 foi obtido 80-90% de rendimento de palatinose a partir de sacarose.

TAKAZOE et alii (1982b) estudaram a síntese de glucana insolúvel por linhagens de *Streptococcus mutans*, formadores de placas dentárias, e sugeriram que a inibição da síntese do polissacarídeo a partir da sacarose pela glicosiltransferase do microrganismo era devido a um mecanismo competitivo. Posteriormente, os autores (1983) confirmaram o mecanismo competitivo, envolvido no processo de inibição da síntese de glucana pela glicosiltransferase de *S. mutans*, através da identificação dos oligossacarídeos produzidos neste sistema de reação, em que a isomaltulose agia como um receptor de base glucosil proveniente da sacarose inibindo a síntese de glucano insolúvel.

Examinando a produção de ácido a partir de isomaltulose em suspensões de placa dental, MAKI et alii (1983), demonstraram que a produção de ácido a partir da isomaltulose foi, geralmente, mais baixa do que a partir da sacarose e glucose, seguida do sorbitol e xilitol. Estes resultados sugerem que os microrganismos presentes na placa dental fermentaram isomaltulose mais lentamente do que a sacarose. Os autores sugeriram também que a isomaltulose possa ser usada como substituto promissor da sacarose por reduzir a incidência de cáries uma vez que é atóxica e bem tolerada.

OOSHIMA et alii (1983a) testou a cariogenicidade de dietas contendo sacarose, palatinose ou mistura destes açúcares utilizando animais experimentais. Para o teste de habilidade de indução de cáries, os ratos alimentados com dieta cariogênica 2000 (citada por KEYES & JORDAN, 1964) contendo 56% de sacarose e dieta substituindo-se a sacarose foram infectados com *S. mutans* MT 8148R (sorotipo C). Após serem sacrificados, os ratos alimentados com palatinose mostraram níveis basais de acúmulo de placa e incidência de cáries, enquanto aqueles alimentados de sacarose apresentaram formação de placa e indução de cáries notáveis. Mesmo a substituição de 50% de sacarose na dieta 2000 por palatinose resultou numa redução marcante na incidência de cáries em relação a dieta 2000 de sacarose. Já a substituição na dieta 2000 por 14% de palatinose resultou na indução de níveis similares de cáries dentais aquelas induzidas pela dieta

2000, os resultados indicam que isto pode estar ocorrendo devido a simples redução na proporção de sacarose da dieta e não devido ao efeito cariostático da palatinose.

Continuando os estudos do efeito da palatinose no desenvolvimento de cáries dentais induzidas por sacarose, em ratos infectados com *S. mutans*, os autores (1983b) verificaram que *S. mutans* 6715 não utilizou palatinose e produziu uma quantidade insignificante de ácido. Além disso, demonstraram que *S. mutans* sorotipos a, d e g não fermentaram palatinose, já os sorotipos b, c, e ou f fermentaram. Foi demonstrado a formação de 3-ceto-derivados e também que a síntese de glucana insolúvel diminuiu significativamente na presença de palatinose. E quando houve uma substituição da metade de sacarose da dieta por palatinose houve decréscimo na formação de cáries dentais, em ratos, quando esta foi comparada com uma dieta constituída só de sacarose.

Dentre as linhagens de *Streptococcus mutans*, estudadas por OHTA e TAKAZOE (1983), foi verificado que, a maior parte delas, foram incapazes de fermentar isomaltulose e as que fermentaram, o fizeram muito lentamente. Foi observado pouca ou nenhuma produção de ácido na presença de isomaltulose, por células de *S. mutans*. A suspensão de placa dental não produziu ou produziu pouco lactato a partir de isomaltulose quando comparada com sacarose e glucose e, a isomaltulose não serviu como um substrato para a síntese de glucana insolúvel em água porém, inibiu sua síntese a partir de sacarose. Os autores consideraram a isomaltulose como um açúcar substituto não cariogênico promissor.

SNODIN et alii (1983) ao estudarem os perfis toxicológicos e a segurança dos adoçantes não nutritivos, citam a palatinose hidrogenada (isomalte, Palatinit®), uma mistura equimolar de β -D-glicopiranosideo-1,6-sorbitol e β -D-glicopiranosideo-1,6-manitol, produzida a partir da hidrogenação da palatinose (isomaltulose ou Lylose®), como um possível substituto da sacarose em vários produtos. Apesar da inexistência de dados quanto a sua toxicidade seus constituintes demonstraram ser lentamente hidrolisados na mucosa intestino humano e pobremente absorvidos, influenciando muito pouco a glicemia e a liberação de insulina no soro humano.

Ao relacionar substitutos nutritivos da sacarose e saúde dental, GRENBY (1983), relataram que a Palatinit®, produzida por conversão enzimática da sacarose em isomaltulose,

seguida da redução do resíduo de frutose da isomaltulose, para a obtenção de uma mistura equimolar de 6-glicosidil-sorbitol e manitol, foi menos cariogênica, em ratos, quando comparada com a sacarose e lactose, além disso, quando utilizadas por *S. mutans* produziram pouco ácido e polissacarídeos extracelular a partir dela, de forma que a Palatinit® parece ser um açúcar substituto conveniente no processo de prevenção de cáries dentais.

CHEETHAM (1984), relatou a utilização de hexosiltransferase (glicosiltransferase) de *Erwinia rhapsodica* N.C.P.P.B. 1578, para a bioconversão de sacarose em palatinose. A enzima era absolutamente substrato-específica para sacarose ($K_m = 0,28M$) e catalisava uma reação essencialmente irreversível. A enzima apresentava um mecanismo de transglicosilação intramolecular com ambos os dissacarídeos ($\alpha 1-6$ e $\alpha 1-1$) sendo formados através de um intermediário comum. O autor relatou que a reação enzimática apresentava uma característica intrínseca formando simultaneamente isomaltulose e trealulose. Em condições extremas, onde o fluxo de substrato através da coluna era interrompido, a concentração de palatinose decrescia e a de trealulose aumentava lentamente.

BIBBY e FU (1985) em estudo *in vitro* compararam a capacidade da placa dental natural de seres humanos converter adoçantes, entre eles a palatinose, para ácidos. Os autores utilizaram três diferentes concentrações de adoçantes (0,1, 1.0 e 10%) e observaram que a isomaltulose ao ser metabolizada, resultou num menor valor de pH, em relação aos outros adoçantes utilizados no teste. Já xilitol, sacarina e aspartame em concentrações mais altas, mostraram um valor de pH mais alto, ao contrário do que ocorreu com os outros adoçantes utilizados. A formação de ácido a partir da sacarose foi influenciada por todos os adoçantes testados.

KAWAI et alii (1985) descreveram as variações glicêmicas e a concentração de insulina liberada em resposta a ingestão de palatinose e de sacarose. Com a administração de sacarose, a glicemia aumentou muito rapidamente até atingir um pico após 30 minutos, retornando ao nível basal após 90 minutos, enquanto que, após a administração de palatinose a concentração glicêmica aumentou gradualmente a partir do nível basal e se manteve quase que constante (aproximadamente 110mg/dl) durante todo o período experimental. Já a concentração plasmática de insulina após a ingestão de palatinose foi significativamente menor do que aquela após a

administração de sacarose. Os autores sugeriram que a diferença se deve a digestibilidade mais lenta da palatinose comparada com a da sacarose, de forma que, sua absorção também ocorre mais lentamente. Os autores sugeriram que a palatinose poderia ser utilizada como adoçante para pacientes diabéticos.

BUCKE et alii (1986), descreveram um método para reduzir a formação de placa dentária, causada por *Streptococcus mutans*, pela substituição de parte da sacarose, utilizada na manufatura de produtos não alcoólicos para o consumo humano e animal, por palatinose.

MINAMI et alii (1990) comparando a característica de utilização de alguns análogos da sacarose por linhagens de microrganismos formadores de placas dentárias, verificaram que todas as linhagens de *S. mutans* e *S. sobrinus*, independentemente do seu sorotipo, produziram quantidades insignificantes de ácido a partir de análogos da sacarose, por exemplo, palatinose, trealulose, turanose e maltulose ao contrário do que ocorre na presença de sacarose. Encontraram também, que os análogos da sacarose não serviam como substrato para a glicosiltransferase de *S. mutans* e *S. sobrinus* e mostraram efeito inibitório na síntese de glucana a partir de sacarose. Foi verificado também, que o valor de Km para a glicosiltransferase foi aumentado na presença de palatinose. O valor de Vmáx, também aumentou quando palatinose foi incorporada ao sistema de reação contendo glicosiltransferase e sacarose. Além disso, *S. mutans* 8148 não teve sua aderência à superfície de vidro inibida pelos análogos da sacarose enquanto que a aderência de *S. sobrinus* 6715 foi inibida pelos análogos da sacarose, exceto pela turanose.

IJIMA et alii (1990) descreveram uma patente de produção de leite condensado adoçado com palatinose e xarope de palatinose, menos cariogênico, de sabor doce e com propriedades físicas equivalentes ao leite condensado contendo sacarose. O produto apresentou boas características durante armazenamento sem a cristalização da palatinose.

Ao revisar alguns trabalhos relativos a cariogenicidade da palatinose, em ratos, HAVENAAR (1987) concluiu que a palatinose parece ser um adoçante de baixa cariogenicidade.

Em 1983, MACDONALD & DANIEL estudaram a biodisponibilidade da isomaltulose utilizando ratos e relataram que a palatinose (20% do total da dieta) foi quase que totalmente hidrolisada no duodeno e, a glicose e frutose liberadas foram reabsorvidas. Os autores sugeriram

que a ingestão de palatinose não provoca nenhum tipo de distúrbio gastrointestinal. Estudos metabólicos mostram que a hidrólise da palatinose é mais lenta do que a sacarose, ZIESENITZ & SIEBERT (1987) e TAKAZOE (1989).

IMFELD (1983) ressaltou a aplicação de açúcares alternativos que substituem os açúcares acidogênicos e reduzem a incidência de cáries dentais. A palatinose foi citada como açúcar alternativo em produtos de confeitaria com a finalidade de reduzir a cárie dental. E o açúcar-álcool Palatinit®, obtido por hidrogenação da palatinose, foi descrito como adequado para diabéticos, tendo aplicações em balas, caramelos, gomas de mascar, chocolates, sorvetes, geléias, bolos, bebidas, etc.

TOPITSOGLU et alii (1984) relataram que havia diminuição significativa na produção de ácidos e glucanas por microrganismos da placa dentária humana, após ingestão de isomaltulose comparado com a sacarose. Outros estudos descritos por ZIESENITZ e SIEBERT (1987), TAKAZOE (1989) também mostram que a palatinose apresenta menor cariogenicidade do que a sacarose. Várias linhagens de *Streptococcus mutans* não utilizam a palatinose.

Os carboidratos são essenciais na iniciação e progressão da cárie dental. A substituição da sacarose, um açúcar altamente cariogênico, pode ser uma solução no controle e prevenção das cáries. Dentre os substitutos da sacarose, a palatinose (isomaltulose) demonstrou uma redução na produção de lactato, redução na síntese de glucana insolúvel (TAKAZOE, 1985).

Em ratos alimentados com dieta Keyes 2000, contendo isomaltulose 56%, ao invés de sacarose e infectados com *Streptococcus mutans* E-49, SASAKI et alii (1985) demonstraram que a isomaltulose foi significativamente menos cariogênica do que sacarose e que a substituição da sacarose por isomaltulose reduziu a incidência de cáries. Após 8 semanas de experimento, o ganho de peso em ratos alimentados com dieta contendo 56% de sacarose ou 56% de palatinose, ou ainda, pela dieta formada pela mistura de sacarose 38,5% e isomaltulose 17,5% foram similares. Além disto, estes grupos não demonstraram sintomas clínicos de distúrbios intestinais.

CHEETHAN et alii (1985) descreveram algumas características da isomaltulose. A isomaltulose é um dissacarídeo solúvel em uma concentração de até 37 g/100ml de água a 20°C, tem ponto de fusão na faixa de 118-122°C, apresenta 37% da doçura da sacarose em uma

concentração de 7% (p/v) em água, é estável à hidrólise ácida na faixa de pH 2,5-6,0; é hidrolisada pela enzima isomaltase do complexo sacarose-isomaltase localizado no intestino delgado humano e os monossacarídeos resultantes são metabolizados rapidamente.

A forma cristalina e o xarope de palatinose são produzidos industrialmente no Japão (BIRCKHED et alii, 1985). A isomaltulose, no Japão, é utilizada como substituto em confeitos, chocolates, gomas de mascar e biscoitos (CLARKE, 1989; NEWBRUN, 1991; KHAN, 1994). Em 1989, CLARKE relatou que aproximadamente 5.000 toneladas de isomaltulose foram usadas na produção de balas não cariogênicas, e que no mercado japonês o custo aproximado da isomaltulose era duas vezes e meia superior ao custo da sacarose. De acordo com KLAN (1994) a isomaltulose é produzida em escala industrial a partir de sacarose usando α -glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum*. No Japão, a palatinose é usada como um adoçante não cariogênico. Na Alemanha, a companhia Südzucker GmbH também produz isomaltulose usando tecnologia similar, convertendo isomaltulose em isomalte por hidrogenação catalítica. A isomaltulose (Palatinose) e o isomalte (Palatinit) estão sendo desenvolvidos como ingredientes de alimentos de caloria reduzida e não cariogênicos.

Estudos realizados por OOSHIMA et alii (1990) com 15 voluntários submetidos a uma dieta e higiene oral controlada demonstraram, após a ingestão de palatinose, uma redução no índice de placa e diminuição de *Streptococcus mutans* na saliva a níveis abaixo do basal quando comparada com a sacarose. Os autores sugeriram que a isomaltulose é um substituto promissor da sacarose.

OOSHIMA et alii (1991), estudando o efeito da trealulose e da palatinose na indução de cáries dentais em ratos infectados com *Streptococcus mutans*, afirmaram que a palatinose induziu a uma formação insignificante de cáries dentais em grupos de ratos alimentados com dieta contendo 56% de palatinose e, o índice de placa também foi baixo em relação a animais alimentados de dieta contendo outros açúcares. Além disso, neste estudo, não foi reconhecido nenhum efeito cariostático da palatinose e também foi demonstrado que a palatinose bem como a trealulose e maltulose inibem moderadamente a atividade de glicosiltransferase de *S. mutans*.

A conversão enzimática da sacarose para isomaltulose e sua posterior hidrogenação química em isomalte [α -D-glicopiranosil 1,6 manitol (GMP) + α -D-glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)], tem sido descrita como uma alternativa para produção de adoçante não cariogênico e dietético (BUCHHOLZ, 1987; BOUTIN, 1992). Neste processo, a isomaltulose ou palatinose, após cristalização, é hidrogenada quimicamente para isomalte, que é um adoçante que apresenta 45-60% da doçura da sacarose em solução aquosa a 20°C. O isomalte é altamente resistente ao aquecimento, modificações químicas e enzimáticas. Tem ponto de fusão na faixa de 145-150°C. Sua densidade e viscosidade são similares a sacarose. Em comparação com outros açúcares álcoois, tais como manitol, sorbitol e xilitol, o isomalte tem uma tendência maior para cristalização e menor higroscopicidade. De acordo com STRÄTER (1985) o isomalte causa alterações insignificantes nos níveis glicêmicos e insulina, não apresenta gosto residual metálico como os adoçantes intensos como por exemplo, sacarina, ciclamato e aspartame. É um agente não redutor, não reage com outros ingredientes do alimento, por exemplo, aminoácidos, que podem causar a reação de Maillard e é um dissacarídeo extremamente estável, não higroscópico com vida de prateleira aumentada.

Devido as suas propriedades, o isomalte pode ser usado como substituto da sacarose em produtos alimentícios de baixa caloria e são adequados para diabéticos (BOLLINGER, 1988; BAER, 1991). Na Europa, o isomalte está sendo empregado em produtos tais como chocolates, caramelos e gomas devido a característica não cariogênica. Em panificação, o isomalte pode substituir a sacarose na proporção 1:1. Pode ser usado também na preparação de sorvete, iogurte e uma variedade ampla de pudins e sobremesas. Formulações de isomalte, para uso em adoçantes, tem sido preparadas usando-se sacarina, ciclamatos, aspartame, acesulfame-K, separados ou combinados (IRWIN, 1990; BOUTIN, 1992).

A isomaltulose pode ser encontrada em escala industrial e tem sido descrita como um intermediário para a síntese de outras substâncias de interesse industrial, como na produção de polímeros e surfactantes (KUNZ, 1991). NOLL-BORCHERS et alii (1993), relataram a modificação microbiana da isomaltulose para 3-ceto-isomaltulose pela ação da D-glucosideo-3-desidrogenase de *Agrobacterium tumefaciens*. Para esta modificação, um processo oxidativo foi

otimizado: 40 a 60g/l de isomaltulose, massa celular de *Agrobacterium tumefaciens* 50g/l, saturação de oxigênio 20 a 30%, pH 7 controlado pela adição automática de NaOH e temperatura de 28°C. WALTER et alii (1995) estudaram a obtenção de derivados de dissacarídeos por oxidação enzimática, dentre eles a palatinose. Neste processo foi estudado a cinética de oxidação enzimática da palatinose para obtenção de 3-cetoisomaltulose. Os autores utilizaram a enzima D-glucosídeo-3 desidrogenase de *Agrobacterium tumefaciens* NCPPB396 e verificaram que o processo oxidativo era dependente de vários fatores, dentre eles a concentração de oxigênio e a concentração dos dissacarídeos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos:

- Agitador incubador, mod. G-25 - New Brunswick Scientific Co. Inc.
- Banhos de água de temperatura controlada Fanem.
- Centrífuga refrigerada, mod. J2-21, Beckman.
- Estufas Bacteriológicas de temperatura controlada Fanem.
- Estufa BOD Fanem.
- Mini-fermentador New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.
- Coletor de Frações Fox 200TM, ISCO, Inc.
- Espectrofotômetro Beckman, mod. DU-70.
- Espectrofotômetro Coleman 295 E.
- Potenciômetros Digimed DMPH-2.
- Ultrasonicador - Ultratip Labsonic, Lab Line, mod. 9100.
- Sistema Ultrafiltrador - Amicon, mod. TCF₂/TCF 2A.
- Câmara Climática, mod 346, Fanem.

3.2. Métodos:

3.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose:

3.2.1.1. Coleta de amostra para isolamento de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose:

Amostras de mel, flores, frutas, caldo, melaço e mosto de usinas de álcool e açúcar, foram coletadas de diferentes regiões do Brasil.

3.2.1.2. Isolamento de microrganismos:

Cerca de 0,5-1,0g de amostra foram adicionadas em tubos de ensaio (15 x 150mm) contendo 5 ml de água destilada previamente esterilizados. Após agitação dos tubos, o líquido sobrenadante foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura 1 composto de 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e 2% de agar. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas. As colônias isoladas e morfologicamente distintas foram repicadas em tubos contendo o meio de cultura previamente esterilizados e os tubos foram incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas. Para a obtenção de culturas puras, os microrganismos foram ressuspensos em tubos contendo 5ml de água estéril e os sobrenadantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura 1 como descrito anteriormente. Após incubação a 30°C, as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura 1 previamente esterilizados. Os tubos de ensaio foram incubados a 30°C durante 24 horas. Para conservação dos microrganismos, adicionou-se vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas foram mantidas a 5°C com repicagem a cada 30-60 dias. As linhagens isoladas foram testadas quanto a capacidade de transformar sacarose em isomaltulose como descrito a seguir.

3.2.1.3. Seleção de microrganismos capazes de converter sacarose em isomaltulose:

Os microrganismos isolados foram inoculados em frascos de 50ml contendo 10ml de meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne (LUND & WYATT, 1973). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm durante 72 horas a 30°C. Alíquotas de 1ml de meio de cultura foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5ml após 24, 48 e 72 horas de fermentação. As amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante 3 minutos e os sobrenadantes foram testados quanto a presença de isomaltulose através de cromatografia em papel.

3.2.1.4. Cromatografia de açúcares em papel:

A cromatografia de açúcares em papel foi realizada em papel Whatman nº1 previamente tratado com ácido bórico 0,25M. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia

descendente em papel foi acetato de etila:isopropanol:água destilada na proporção 6:3:1 (v/v), respectivamente.

O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 15 horas para fita de papel de 46cm de comprimento. Utilizou-se os açúcares padrões sacarose, glicose, frutose e isomaltulose para comparação. Os açúcares foram revelados com anilina-difenilamina-ácido fosfórico (SCHWIMMER & BEVENUE, 1956).

3.2.1.5. Determinação da atividade enzimática de glicosiltransferase:

A atividade da enzima glicosiltransferase foi determinada pelo aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose como descrito por NAGAI-MIYATA et alii (1993) e UEKANE (1993) com modificações. A mistura de 900µl da solução 10% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0 e 100µl de solução enzimática foi incubada a 40°C ou na temperatura indicada por 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1944), utilizando-se isomaltulose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro utilizou-se Branco substituindo-se 100µl de amostra por 100µl de água destilada na mistura de reação. Este teste foi realizado em triplicata. Uma unidade de glicosiltransferase foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de isomaltulose/minuto/ml da enzima a partir de sacarose sob as mesmas condições do ensaio.

3.2.2. Identificação da linhagem produtora de glicosiltransferase:

Para a identificação da linhagem D-12 foram testados: produção de indol, produção de H₂S, reação de VM e VP, utilização de citrato, redução de nitrato, produção de urease, produção de oxidase, produção de catalase, hidrólise de gelatina, produção de ornitina descarboxilase, arginina descarboxilase, lisina descarboxilase, produção de fenilalanina desaminase, produção de ácidos a partir de: arabinose, inositol, lactose, maltose, manitol, sorbitol, sacarose e xilose, de acordo com MAC FADDIM (1980) e HOLT et alii (1994). Foram utilizadas para comparação as linhagens padrões de *Klebsiella* sp. 192, *Klebsiella* sp. n°18 e *Salmonella enteritidis*.

3.2.3. Estudo da produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12 em diferentes meios de cultura:

A linhagem D-12 foi testada quanto a produção de glicosiltransferase em diferentes meios de cultura. A TABELA 1 mostra a composição dos meios de cultura.

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

	Meio 1 Lund e Wyatt (1973)	Meio 2 Bender e Wallenfels (1961)	Meio 3 Sugimoto et alii (1974)	Meio 4 Ueda e Ohba (1972)
Sacarose	4%	4%	4%	4%
Peptona	1%	0,8%		
Extrato de carne	0,4%			
Glutamato			0,4%	
KH ₂ PO ₄		0,1%	0,1%	0,1%
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,05%	0,05%	0,05%
NaNO ₃		0,5%		0,25%
KCl		0,05%		0,05%
(NH ₄) ₂ HPO ₄			0,15%	
FeCl ₃ .6H ₂ O			0,001%	
NaCl ₂ .4H ₂ O			0,001%	
FeSO ₄ .7H ₂ O		0,001%		
K ₂ SO ₄				0,2%
CH ₃ COONH ₄				0,75%
NaCl			0,001%	
pH	7,0	7,0	7,0	7,0

O meio de cultura 1 descrito por LUND & WYATT (1973) para a conversão de sacarose em isomaltulose pela linhagem *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* G-120 foi testado para a produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12. Os meios de cultura utilizados anteriormente por BENDER e WALLENFELS (1961) para a produção de pululanase de *Aerobacter aerogenes* e por SUGIMOTO et alii (1974) para a produção de isoamilase por *Pseudomonas* SB 15 foram testados para a produção de glicosiltransferase substituindo-se a fonte de carbono por 4% de sacarose. O meio de cultura descrito anteriormente por UEDA e OHBA (1972) para a produção

de pululanase de *Aerobacter aerogenes* também foi testado para a produção de glicosiltransferase substituindo-se a fonte de carbono (amido) por 4% de sacarose.

A cultura jovem da linhagem D-12 foi inoculada com alça em frascos de Erlenmeyer de 50ml contendo 10ml dos meios 1, 2, 3 e 4 ajustados a pH7,0 descritos na TABELA 1, previamente esterilizados e os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200rpm a 30°C. As amostras foram retiradas após 24, 48 e 72 horas de fermentação, centrifugadas a 20.000rpm por 10 minutos e foram testadas a atividade de glicosiltransferase no sobrenadante do meio de cultura e na massa celular como descrito a seguir.

3.2.3.1. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante do meio de cultura:

A atividade de glicosiltransferase no sobrenadante dos meios de cultura nº1, 2, 3 e 4 obtidos de acordo com o item 3.2.3 foi determinado como descrito no item 3.2.1.5. na temperatura de 35°C. Para controle determinou-se a concentração de açúcares redutores presentes nos sobrenadantes dos meios de cultura.

3.2.3.2. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada:

A massa celular resultante da centrifugação dos meios de cultura nº1, 2, 3 e 4 da linhagem D-12 foi lavada 3 vezes com água destilada. Em seguida, a massa celular foi ressuspensa em 15ml de água destilada e a suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a tratamento em ultrasonicador por 20 segundos a 180-200W. Após a lise da parede celular as amostras foram centrifugadas a 20.000rpm durante 10 minutos e a atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante como descrito anteriormente no item 3.2.1.5.

3.2.4. Efeito da concentração de sacarose e peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12:

3.2.4.1. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12:

Para o estudo do efeito da concentração do carboidrato sacarose, no meio de cultura, na produção de glicosiltransferase, foram utilizados meios constituídos de 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e concentrações de sacarose variável entre 0 a 10%. Os frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de meio de cultura foram inoculados com 200µl de uma suspensão homogênea de uma cultura de 24 horas do microrganismo D-12 em água destilada estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C por 24 e 48 horas. Após o período de incubação a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada para a determinação do crescimento celular como descrito no item 3.2.4.1.1. e, a atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada foi determinada após três lavagens das massas celulares como descrito no item 3.2.4.1.2. na temperatura de 35°C. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.4.1.1. Determinação da massa celular seca:

Para a determinação da produção de massa celular seca traçou-se a curva Absorbância X Massa celular seca (mg/ml). A linhagem D-12 foi inoculada separadamente em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de meio de cultura composto de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne.

Após a incubação a 30°C durante 24 horas, 750ml do meio de cultura da linhagem D-12 foram centrifugados a 11.000 rpm a 5°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi lavada três vezes com água destilada. A massa celular da linhagem D-12 foi ressuspendida em 30ml de água destilada. A partir da suspensão da linhagem D-12 foram preparadas diluições para medida de absorbância a 660nm, contra água destilada. Aliquotas de 5ml da suspensão da linhagem D-12 testadas em duplicata foram submetidas a secagem em estufa a 100°C até a obtenção de peso constante.

3.2.4.1.2. Extração da glicosiltransferase intracelular da linhagem D-12:

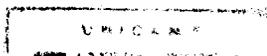
A massa celular resultante da centrifugação do meio de cultura para a fermentação da linhagem D-12 foi lavada 3 vezes com água destilada. Em seguida, a massa celular foi ressuspendida em 20ml de água destilada e a suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a tratamento em ultrasonicador por 20 segundos a 180-200W. Após a lise da parede celular a amostra foi centrifugada a 11.000 rpm durante 15 minutos e a atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante como descrito no item 3.2.1.5. na temperatura de 35°C.

3.2.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12:

No estudo do efeito da concentração de peptona no meio de cultura, na produção de glicosiltransferase pela linhagem D-12, foi utilizado meio constituído de 6% de sacarose, 0,4% de extrato de carne e concentrações variáveis de peptona na faixa de 0 a 7%. Os frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de meio de cultura foram inoculados com 200µl de uma suspensão homogênea de uma cultura jovem do microrganismo D-12 em água destilada estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm a 30°C por 24 horas. Após o período de incubação a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada para a determinação do crescimento celular como descrito no item 3.2.4.1.1. e, a atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada foi determinada após três lavagens da massa celular como descrito no item 3.2.4.1.2. na temperatura de 35°C. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.5. Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de enzima a 28°C, 30°C e 35°C:

A linhagem D-12 que apresentou atividade de glicosiltransferase, capaz de converter sacarose em isomaltulose, foi utilizada para os estudos de produção de glicosiltransferase em mini-fermentador de 2 litros.



3.2.5.1. Preparação do inóculo:

Para a preparação do inóculo, alíquotas de 100µl de suspensão celular da linhagem D-12 em água destilada estéril foi inoculada assepticamente em dois frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml do meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 6% de peptona e 0,4% de extrato de carne. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 30°C em agitador rotatório a 200rpm por um período de 12 horas.

3.2.5.2. Fermentação:

A fermentação foi realizada em mini-fermentador de 2 litros. Adicionou-se assepticamente 100ml do inóculo preparado de acordo com o item anterior e 1ml de óleo de soja estéril como antiespumante ao frasco de cultura contendo 1.100ml de meio de cultura previamente esterilizado. A fermentação foi realizada a 28°C, 30°C e 35°C, mantendo-se aeração de 1vvm (volume/volume/minuto) e agitação constante. As amostras do meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.2.5.3. e determinação da atividade enzimática. A atividade de glicosiltransferase foi determinada, no sobrenadante da massa celular sonicada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5. Para a extração da glicosiltransferase intracelular 20ml de suspensão de células em água destilada, provenientes de 50ml do meio de fermentação, foi submetida a ultrasonicação durante 20 segundos a 200 Watts, como descrito no item 3.2.4.1.2.

3.2.5.3. Determinação do Crescimento do Microrganismo:

O crescimento celular foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660nm. Após a fermentação, amostras de 50ml do meio de cultura foram centrifugados a 11.000rpm a 5°C durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as massas celulares foram lavadas duas vezes com água destilada nas mesmas condições descritas acima. As massas celulares assim obtidas foram ressuspensas em 50ml de água destilada e, quando necessário, as suspensões foram diluídas. A leitura de absorbância das amostras foram realizadas contra água destilada a 660nm.

3.2.6. Produção e Purificação da Glicosiltransferase:

3.2.6.1. Produção da Glicosiltransferase:

Para a produção de glicosiltransferase, a linhagem D-12, foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 6% de peptona e 0,4% extrato de carne. Os frascos esterilizados foram inoculados com 12,5ml de inóculo preparado de acordo como item 3.2.5.1. e incubados em agitador rotatório à velocidade constante de 200rpm, a 30°C durante 8 horas. Após a fermentação, o sobrenadante do meio de cultura e a massa celular foram separados por centrifugação a 11.000rpm durante 15 minutos a 5°C. Para a extração da enzima glicosiltransferase, a massa celular foi lavada 3 vezes com água destilada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 100ml de água destilada e rompida por oscilação ultrasônica durante 1 minuto e 20 segundos. A amostra foi centrifugada nas condições descritas acima. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como preparação enzimática bruta a ser purificada de acordo com o item 3.2.6.2. A atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5. A concentração de proteína das soluções enzimáticas, foi determinada de acordo com o método de Lowry modificado por HARTREE (1972).

3.2.6.2. Purificação da Glicosiltransferase:

3.2.6.2.1. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50

Cerca de 7g de DEAE-Sephadex A-50 foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0.

Uma alíquota de 50ml de solução enzimática de glicosiltransferase da linhagem D-12 contendo 731 unidades de atividade obtida de acordo com o item 3.2.6.1. foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A-50 de 2,5cm de diâmetro e 40cm de comprimento e equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 300ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0 e quantidades alternadas de 100ml e 200ml de tampão

citrato-fosfato 0,05M pH7,0 contendo concentrações crescentes de NaCl (0,1; 0,2; 0,3;... a 0,9M), sucessivamente e, em seguida, 500ml do mesmo tampão contendo a concentração de 1M de NaCl. As frações de 5ml foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso da eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280nm. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5. As frações de nº14 a 27 foram reunidas num total de 70ml. Destes 70ml, 50ml foram aplicados em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B de acordo com o método descrito a seguir.

3.2.6.2.2. Cromatografia da Glicosiltransferase em Coluna de DEAE-Sepharose CL-6B:

Cerca de 200ml de DEAE-Sepharose CL-6B foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0.

A amostra de 50ml de solução enzimática obtida de acordo com o método descrito no item 3.2.6.2.1., contendo 583,1 unidades de atividade, foi aplicada em coluna de DEAE-Sepharose CL-6B de 2,5cm de diâmetro e 40cm de comprimento. Iniciou-se a eluição com 300ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0, seguida da aplicação de 100ml do mesmo tampão contendo concentração de 0,1M de NaCl e da aplicação de 495ml do mesmo tampão contendo concentração 1M de NaCl, consecutivamente. As frações de 5ml foram coletadas utilizando-se coletor de frações. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280nm e pela determinação da atividade de glicosiltransferase de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5. As frações de nº18 a 28 contendo atividade de glicosiltransferase foram reunidas num total de 55ml e conservada em congelador.

3.2.7. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada da linhagem D-12:

A glicosiltransferase da linhagem D-12 purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.6.2.2. foi utilizada para o estudo de caracterização da enzima.

3.2.7.1. Efeito da Concentração do Substrato na Atividade Enzimática:

No estudo do efeito da concentração de substrato, o sistema de reação foi constituído de 100µl de solução de glicosiltransferase purificada contendo 0,10 unidades de atividade e 900µl de solução de sacarose, em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0, na concentração em relação ao volume final, variável entre 0,03M e 0,3M. As misturas de reação foram incubadas durante 20 minutos em banho de água termostatizado a 40°C e a atividade de glicosiltransferase foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{máx}$) foram determinados segundo o sistema gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934).

3.2.7.2. Efeito do pH na Atividade Enzimática:

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 100µl de solução de glicosiltransferase purificada, obtido da linhagem D-12, contendo 0,10 unidades de atividade, 650µl de solução de sacarose 13,84% e 250µl de tampão 0,2M citrato-fosfato, fosfato de sódio, acetato ou borato em diferentes pHs, que foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato 2,6 a 7,0, fosfato de sódio 5,0 a 8,0, acetato 3,6 a 5,5 e borato 8,0 a 9,0. As misturas de reação foram incubadas a 40°C em banho de água termostatizado por 20 minutos. Após a incubação, a atividade de glicosiltransferase foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.7.3. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima Purificada:

Para o estudo do efeito do pH na atividade da enzima, 50µl da solução de glicosiltransferase purificada obtida da linhagem D-12 contendo 0,05 unidades de atividade e 50µl de soluções tampão 0,2M citrato-fosfato 2,6 a 7,0, fosfato de sódio 5,0 a 8,0, acetato 3,6 a 5,5 e borato 8,0 a 9,0 foi incubada durante 24 horas a 5°C. A atividade residual foi determinada pela adição de 900µl de sacarose 10% em tampão citrato-fosfato 0,2M pH6,0 às soluções enzimáticas e as misturas de reação foram incubadas a 40°C durante 20 minutos. A atividade de

glicosiltransferase foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.7.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática:

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 900µl de sacarose 10% em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0 e 100µl de solução de glicosiltransferase purificada obtida da linhagem D-12 contendo 0,10 unidades de atividade. A mistura de reação foi incubada em diferentes temperaturas de 10 a 70°C durante 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1944) como descrito no item 3.2.1.5., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.7.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade Enzimática:

Para o estudo da termoestabilidade da glicosiltransferase purificada da linhagem D-12, amostras de 100µl de solução enzimática, contendo 0,10 unidades de atividade, em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0 foram adicionadas em tubos os quais foram incubados em diferentes temperaturas na faixa entre 10 a 70°C durante 1 hora, 3 horas, 5 horas e 24 horas. Após o tratamento térmico, os tubos contendo 100µl de solução de glicosiltransferase foram resfriados e a atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5. Este teste foi realizado em triplicata.

3.2.7.6. Efeito de Sais Minerais e outros Compostos Inorgânicos na Atividade da Glicosiltransferase:

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado dentro da faixa de concentração onde não havia interferência com o método de determinação de atividade. Para o estudo do efeito de sais minerais na atividade de glicosiltransferase, o sistema de reação foi constituído de 800µl de solução de sacarose 11,25% em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0, 100µl da solução enzimática purificada contendo 0,10 unidades de atividade e 100µl de solução contendo um dos seguintes compostos: CuSO₄, KCl, MgSO₄, MnSO₄, CaCl₂, BaCl₂, CoCl₂.

HgCl₂, AgNO₃, NaCl, ZnCl₂, FeCl₃, Pb(CH₃COO)₂ e Na₂HAsO₄ na concentração de 0,1, 1,0 e 10 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação. Após 20 minutos de incubação a 40°C, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON (1944) como descrito no item 3.2.1.5. Utilizou-se Branco substituindo-se 100µl da enzima por 100µl de água destilada na mistura de reação.

3.2.7.7. Efeito de Inibidores na Atividade da Glicosiltransferase:

O efeito de inibidores de enzimas foi verificado de forma similar ao efeito de sais minerais na atividade enzimática. Para o estudo do efeito de inibidores na atividade da glicosiltransferase, o sistema de reação foi constituído de 800µl de solução de sacarose 11,25% em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0, 100µl de solução enzimática purificada contendo 0,10 unidades de atividade e 100µl de solução de um dos reagentes: azida de sódio, ácido etilenodiaminotetracético, L-cisteína, N-bromosuccinimida, p-cloromercuribenzoato, dietilditiocarbamato de sódio na concentração 0,1, 1,0 e 10mM e, iodacetamida nas concentrações de 0,1 e 1,0 em relação ao volume final da reação da mistura. A atividade residual foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5. Utilizou-se Branco substituindo-se 100µl de enzima por 100µl de água destilada na mistura de reação.

3.2.7.8. Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase da Linhagem D-12:

O peso molecular da enzima purificada foi estimado por filtração em coluna de gel de Sephadex G-200, conforme metodologia descrita por ANDREWS (1965). As proteínas anidrase carbônica, albumina de soro bovino e β-amilase de batata doce (Sigma MW-GF-200) de pesos moleculares 29.000, 66.000 e 200.000, respectivamente, foram utilizadas como padrões. Previamente, 50g de Sephadex G-200 foram intumescidas com 2L de solução KCl 0,1M durante 2 dias a 10°C e em seguida equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M pH7,5 contendo KCl 0,1M. As proteínas padrões e a enzima purificada foram dissolvidas em 3 ml de solução tampão e percoladas em coluna de Sephadex G-200 (2cm Ø x 100cm de comprimento). As frações de 2,8ml foram coletadas a cada 15 minutos. A coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão com “Blue Dextran 2000”.

3.2.8. Aplicação da glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de sacarose:

3.2.8.1. Efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose:

A conversão de sacarose em isomaltulose foi testada incubando-se 8 ml de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0 para concentração final de 5% de substrato e 2 ml de preparação de glicosiltransferase bruta contendo 14,62 unidades de atividade por ml obtida de acordo com o item 3.2.6.1. nas temperaturas de 30°, 35° e 40°C. Os açúcares formados foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se cromatógrafo CG-480C com detector de índice de refração IR-CG410 a 50°C e coluna YMC-ODS-A de 4,6 X 250mm a 35°C. Utilizou-se água filtrada em MilliQ e degaseificada como fase móvel. Foram empregados os açúcares sacarose, isomaltulose, glicose e frutose como padrões comparativos. As amostras e as soluções de açúcares padrões foram filtradas em membranas de éster de celulose 0,45 µm antes de serem injetadas no cromatógrafo.

3.2.8.2. Aplicação da glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de solução 5% e 10% de sacarose a 40°C:

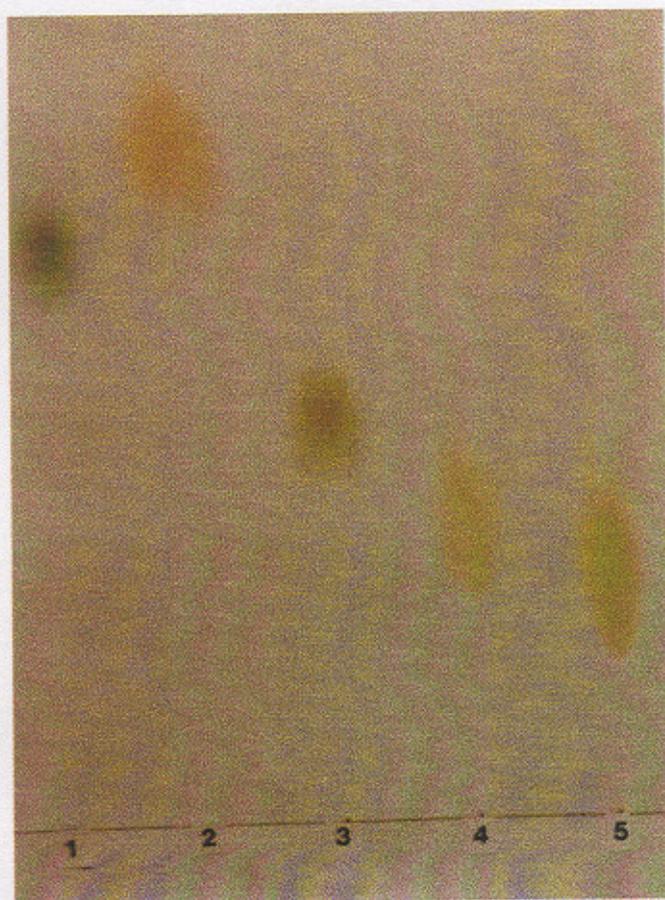
A mistura de 8 ml de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 para a concentração final de 5% ou 10% de substrato e 2 ml de preparação de glicosiltransferase bruta obtida de acordo com o item 3.2.6.1. foi incubada a 40°C. Após 1, 2, 4 e 8 horas de reação foram retiradas alíquotas de 1 ml da mistura de reação e os açúcares formados foram determinados como descrito no item anterior.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de glicosiltransferase:

Após o isolamento de 314 linhagens de microrganismos osmofílicos, de amostras de mel, flores, frutas, caldo, melaço e mosto de usina de álcool e açúcar, foi selecionada uma linhagem de bactéria denominada D-12 produtora de glicosiltransferase, de acordo com o método descrito no item 3.2.1. A FIGURA 1 ilustra a detecção de isomaltulose no sobrenadante do meio cultivado com a linhagem D-12 produtora de glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose.

FIGURA -1 CONVERSÃO DA SACAROSE EM ISOMALTULOSE PELA GLICOSILTRANSFERASE DA LINHAGEM D-12.



1. glicose
2. frutose
3. sacarose
4. isomaltulose
5. sobrenadante do meio de cultura 1 após fermentação da linhagem D-12

4.2. Identificação da linhagem produtora de glicosiltransferase:

A linhagem D-12 foi identificada como *Erwinia* sp. As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da linhagem D-12 estão ilustradas na TABELA 2.

TABELA 2- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DA LINHAGEM *Erwinia* sp. D-12

	Linhagem D-12
Bastonete Gram	-
Produção de Indol	-
H ₂ S em meio de TSI	-
Teste de Voges Proskauer	+
Teste de Vermelho de Metila	-
Citrato	+
Nitrato	+
Oxidase	-
Catalase	+
Urease	-
Ornitina descarboxilase	-
Arginina descarboxilase	+
Lisina descarboxilase	-
Fenilalanina desaminase	+
Liquefação da Gelatina	-
Formação de ácidos a partir de:	
Arabinose	+
Glicose	+
Inositol	-
Lactose	-
Maltose	+
Manitol	+
Sorbitol	+
Sacarose	+
Xilose	+

Entre as linhagens produtoras de glicosiltransferase, capazes de converter sacarose em isomaltulose com alto rendimento descritas na literatura se destacam os microrganismos

Protaminobacter rubrum (MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, citado por McALLISTER et alii, 1990), *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (LUND & WYATT, 1973), *Erwinia rhapontici* (CHEETHAN et alii, 1982 e 1985), *Serratia plymuthica* (MAUCH & SCHMIDT-BERG-LORENZ, citado por McALLISTER et alii, 1990), (FUJI et alii, 1983) e (McALLISTER et alii, 1990) e *Klebsiella* sp. (UEKANE, 1993).

4.3. Produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 em diferentes meios de cultura:

Entre os meios de cultura testados, verificou-se maior produção de glicosiltransferase intracelular pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 no meio de cultura 1 composto de 4% de sacarose, 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne descrito por LUND & WYATT (1973) para a produção de isomaltulose a partir de sacarose pela linhagem *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* C-120 e no meio de cultura 2 composto de 4% de sacarose, 0,8% de peptona, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de NaNO_3 e 0,05% de KCl. No meio de cultura 1 foi obtido 0,27 unidades de atividade/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação a 30°C. Foi observado que a atividade diminui com o tempo de fermentação, sendo obtido 0,23 e 0,21 unidades de atividade/ml de meio de cultura após 48 e 72 horas. Utilizando-se o meio de cultura 2 foi obtido 0,27 unidades de atividade/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação a 30°C sendo que a atividade na massa celular sonicada permaneceu constante até 72 horas de incubação. No estudo da produção de glicosiltransferase no meio de cultura 3 foi obtido 0,11 unidades de atividade/ml de meio de cultura após 24 horas de incubação enquanto que a produção de enzima no meio de cultura 4 foi baixa sendo obtido 0,01 unidade de atividade/ml de meio de cultura. A TABELA 3 ilustra os resultados.

**TABELA 3- PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA LINHAGEM
Erwinia sp. D-12 EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Meios de Cultura	Atividade de glicosiltransferase (Unidades de atividade/ml de meio de cultura)					
	Sobrenadante do meio de cultura			Sobrenadante da massa celular sonicada		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24 horas	48horas	72horas	24horas	48horas	72horas
1	0,0	0,0	0,0	0,27	0,23	0,21
2	0,0	0,0	0,0	0,27	0,27	0,27
3	0,0	0,0	0,0	0,11	0,11	0,11
4	0,0	0,0	0,0	0,01	0,01	0,01

UEKANE (1993) estudando a produção de glicosiltransferase pela linhagem de *Klebsiella* sp. n°18, que converte sacarose em isomaltulose, em meio de cultura composto de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne obtiveram 0,167 unidades de glicosiltransferase/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação a 30°C.

4.4. Efeito da concentração de sacarose e peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12:

4.4.1. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12:

O estudo do efeito da concentração do carboidrato sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 foi realizado segundo o método descrito no item 3.2.4.1. Foi obtido maior produção da enzima glicosiltransferase (0,82 unidades de atividade/ml do sobrenadante da massa celular sonicada) pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 em meio de cultura contendo 6% de sacarose. A TABELA 4 ilustra os resultados obtidos.

TABELA 4- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA LINHAGEM *Erwinia* sp. D-12

Concentração de Sacarose (%)	Massa celular seca (mg/ml)		Atividade de glicosiltransferase (Unidade de atividade/ml do sobrenadante da massa celular sonicada)	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
0	1,38	1,44	0,20	0,20
1	2,11	3,44	0,25	0,22
2	1,77	3,66	0,26	0,25
4	1,94	2,88	0,29	0,26
6	2,83	3,55	0,82	0,28
8	2,72	4,55	0,39	0,25
10	2,44	5,00	0,05	0,26

McALLISTER et alii (1990) utilizaram o meio de cultura composto de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato Lab Lemco para produção de glicosiltransferase intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15928.

UEKANE (1993) verificou o efeito da concentração de sacarose no meio de cultura na produção de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18. A autora utilizou meios de cultura contendo 1% de peptona, 0,4% de extrato de carne e concentrações de sacarose variável entre 0 a 4%. A produção máxima de enzima de 0,167 unidades de glicosiltransferase/ml de meio de cultura foi obtida em meio contendo 4% de sacarose.

4.4.2. Efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12:

O estudo do efeito da concentração de peptona no meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 foi realizado segundo o método descrito no

item 3.2.4.2. A maior produção da enzima glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 (0,76 unidades de atividade/ml do sobrenadante da massa celular sonicada) foi obtida em meio de cultura contendo 6% de peptona, 6% de sacarose e 0,4% de extrato de carne. A TABELA 5 ilustra os resultados obtidos.

TABELA 5- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA NO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE PELA LINHAGEM *Erwinia* sp. D-12

Concentração de peptona (%)	Massa celular seca (mg/ml)	Atividade de glicosiltransferase (Unidades de atividade/ ml do sobrenadante da massa celular sonicada)
	24 horas	24 horas
0	0,27	0,39
1	0,33	0,48
2	0,28	0,41
3	0,34	0,50
4	0,28	0,41
5	0,45	0,66
6	0,52	0,76
7	0,40	0,58

UEKANE (1993) utilizando a linhagem *Klebsiella* sp. K n°18 obteve produção máxima de glicosiltransferase intracelular (0,167 unidades de atividade/ml do meio de cultura) em meio de cultura composto de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne após 24 horas de fermentação a 30°C.

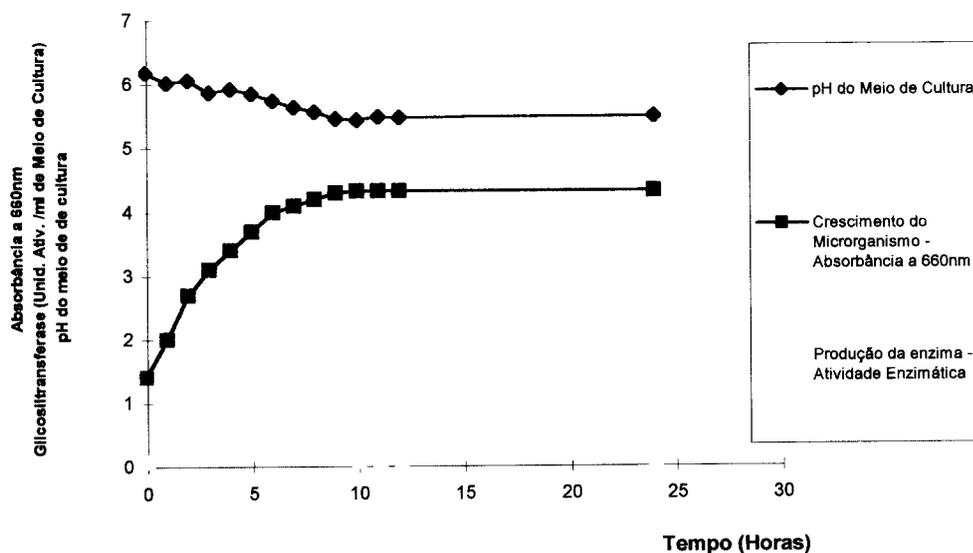
4.5. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração do pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 28°C, 30°C e 35°C:

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D-12 foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.5.

As FIGURAS 2, 3 e 4 ilustram respectivamente a relação entre o tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase a 28°C, 30°C e 35°C.

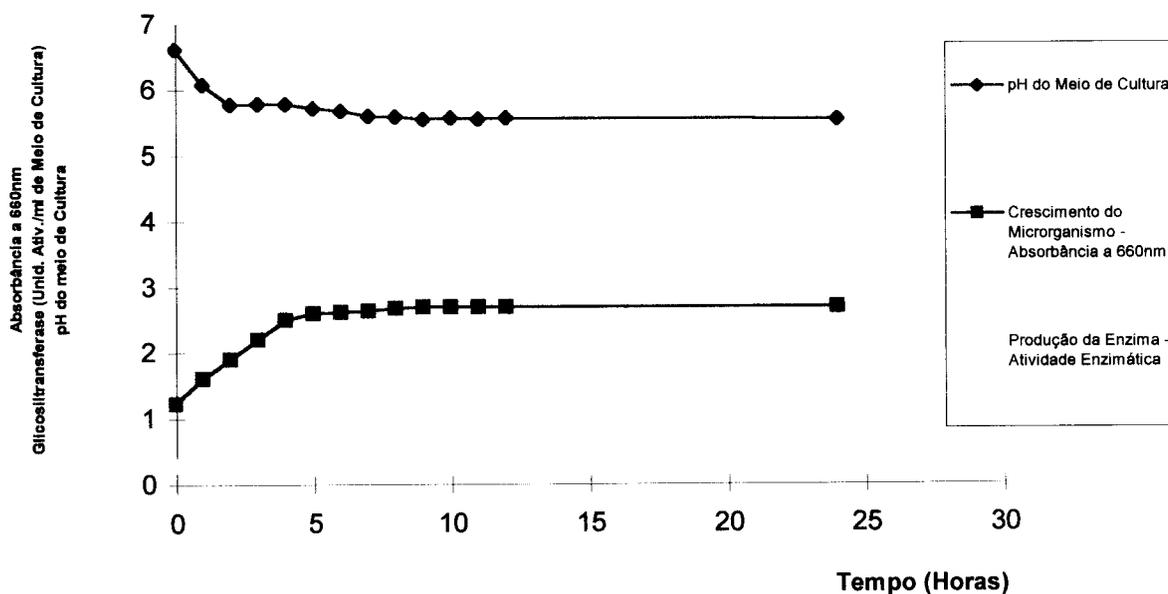
Na fermentação a 28°C a produção de glicosiltransferase intracelular foi verificada na fase exponencial de crescimento e atingiu a atividade máxima de 2,22 unidades/ml de meio de cultura após 3 horas de fermentação. Após este período, foi observado uma diminuição gradativa da atividade de glicosiltransferase, sendo que, após 10 horas de fermentação a atividade diminuiu para 0,08 unidades/ml de meio de cultura (FIGURA 2).

FIGURA 2- ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 28°C



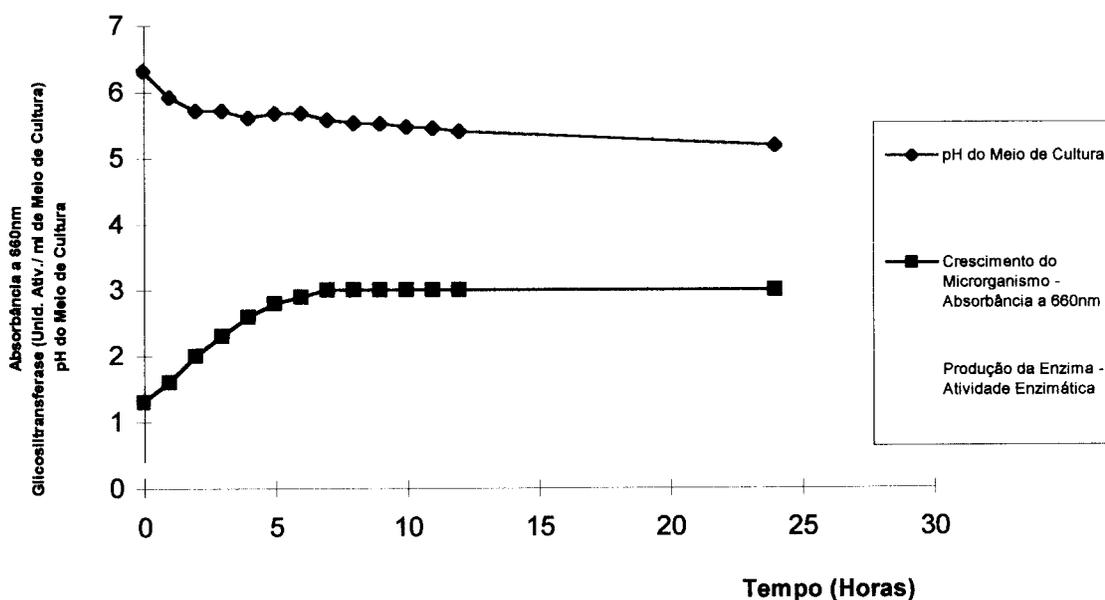
Na fermentação a 30°C a glicosiltransferase intracelular foi produzida na fase exponencial de crescimento atingindo a atividade máxima de 1,45 unidades/ml de meio de cultura após 4 horas, no final da fase exponencial. Após este período, a atividade diminuiu lentamente e, após 24 horas de incubação a atividade atingiu 0,96 unidades/ml de meio de cultura (FIGURA 3).

FIGURA 3- ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 30°C



Na fermentação a 35°C a produção de glicosiltransferase foi verificada na fase exponencial e atingiu o máximo de 1,13 unidades/ml de meio de cultura após 4 horas de fermentação diminuindo após este período. Após 24 horas de fermentação, a atividade de glicosiltransferase diminuiu para 0,68 unidades/ml de meio de cultura. Nestes experimentos, verificou-se que a glicosiltransferase não é liberada no sobrenadante do meio de cultura (FIGURA 4).

FIGURA 4- ESTUDO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE A 35°C



No estudo da produção de glicosiltransferase em diferentes temperaturas foi observado que a produção de glicosiltransferase foi máxima a 28°C sendo obtido 2,22 unidades de atividade/ml de meio de cultura após 3 horas de incubação. O aumento da temperatura de fermentação promoveu a diminuição da produção de enzima pela linhagem de *Erwinia* sp. D-12.

McALLISTER et alii (1990) verificaram que a produção máxima de glicosiltransferase intracelular na fermentação de *Serratia plymuthica* ATCC 15298 em meio de cultura constituído

de 40g/L de sacarose, 10g/L de peptona e 4,0g/L de extrato LabLemco a 30°C ocorria após 16 horas de fermentação.

UEKANE (1993) verificou que na fermentação de *Klebsiella* sp. n°18 em meio de cultura constituído de 4% de sacarose, 1% de peptona e 0,4% de extrato de carne a 30°C, a glicosiltransferase intracelular foi produzida na fase exponencial de crescimento, atingindo a atividade máxima de 0,167 unidades/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação permanecendo constante até 32 horas aproximadamente. Após este período, foi observado diminuição da atividade intracelular, sendo que após 80 horas de fermentação, a atividade foi de aproximadamente 0,097 unidades/ml de meio de cultura. Na fermentação a 36°C a produção de glicosiltransferase intracelular alcançou atividade máxima de 0,082 unidades/ml de meio de cultura após 24 horas de fermentação diminuindo rapidamente após 32 horas de fermentação.

NAGAI-MIYATA et alii (1993) relataram que a produção máxima de α -glicosiltransferase pela linhagem *Agrobacterium radiobacter* MX-232, que converte sacarose principalmente em trealulose, foi obtida após 60 horas de fermentação em meio composto de 0,1% de extrato de carne, 1% de peptona, 0,3% de NaCl, 0,1% de extrato LabLemco e 6% de melaço ajustado a pH7,0.

4.6. Produção e purificação da Glicosiltransferase:

4.6.1. Produção da glicosiltransferase:

A produção e purificação de glicosiltransferase foram realizadas de acordo com o método descrito no item 3.2.6. Após a fermentação da linhagem *Erwinia* sp. D-12 em 1000ml de meio de cultura constituído de 6% de sacarose, 6% de peptona e 0,4% de extrato de carne a 30°C e extração da enzima intracelular foi obtida uma preparação enzimática bruta contendo 14,62 unidades de atividade/ml e atividade específica 1,46 unidades/mg de proteína.

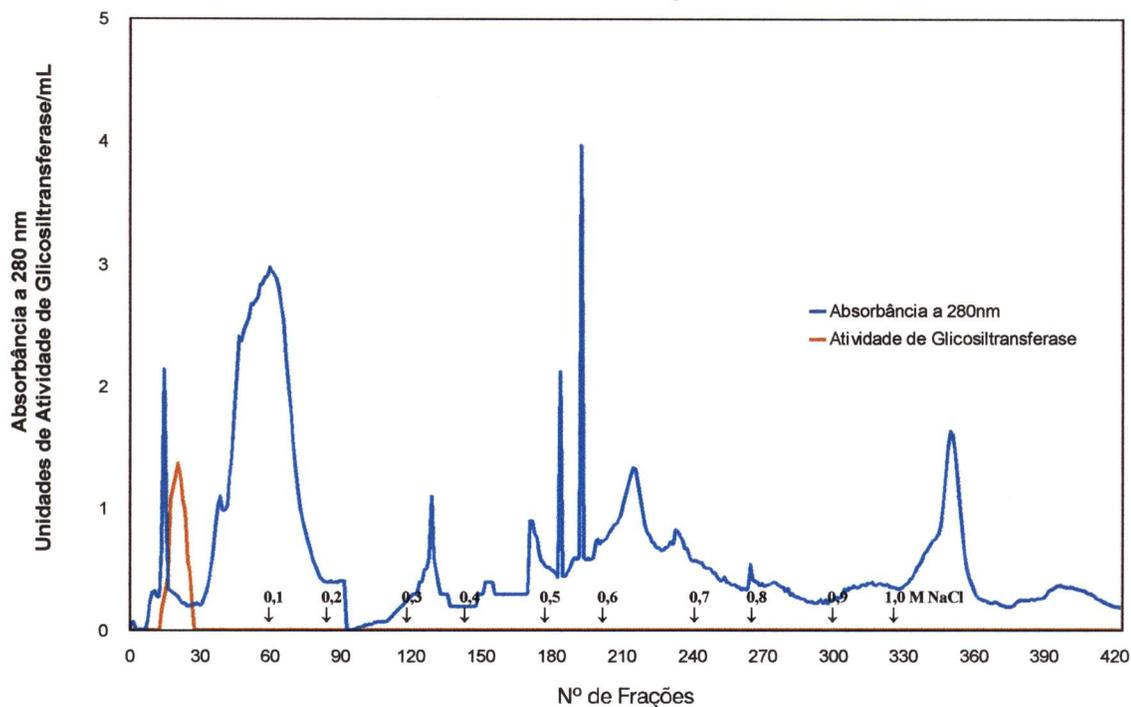
UEKANE (1993) obteve uma preparação bruta de glicosiltransferase intracelular de *Klebsiella* sp. n°18, apresentando 2,95 unidades/ml e atividade específica de 0,014 unidades/mg

de proteína após fermentação da bactéria em meio de cultura constituído de 1% de peptona, 4% de sacarose e 0,4% de extrato de carne a 30°C e extração da enzima através do rompimento celular por oscilação ultrasônica.

4.6.2. Purificação da Glicosiltransferase:

A purificação da glicosiltransferase intracelular da linhagem de *Erwinia* sp. D-12 foi realizada como descrito no item 3.2.6.2. A preparação enzimática bruta de glicosiltransferase foi purificada cerca de 28 vezes após fracionamento em coluna de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0 (FIGURA 5). A enzima glicosiltransferase foi fracamente adsorvida na resina sendo eluída após aplicação de cerca de 100ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0. A preparação enzimática de glicosiltransferase obtida apresentou 41,65 unidades/mg de proteína.

FIGURA 5- CROMATOGRAFIA DA GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE DEAE-Sephadex A-50



No fracionamento subsequente da glicosiltransferase em resina de DEAE-Sepharose CL-6B equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH 7,0 foi obtida preparação enzimática com 19,80 unidades/mg de proteína. A glicosiltransferase foi fracamente adsorvida na resina sendo eluída após aplicação de cerca de 100ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH7,0. A diminuição da atividade específica sugere que a enzima glicosiltransferase é instável na forma purificada. A FIGURA 6 ilustra o fracionamento da glicosiltransferase em DEAE-Sepharose CL-6B. A TABELA 6 ilustra a purificação da glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12.

FIGURA 6- CROMATOGRAFIA DE GLICOSILTRANSFERASE EM COLUNA DE DEAE-Sepharose CL-6B

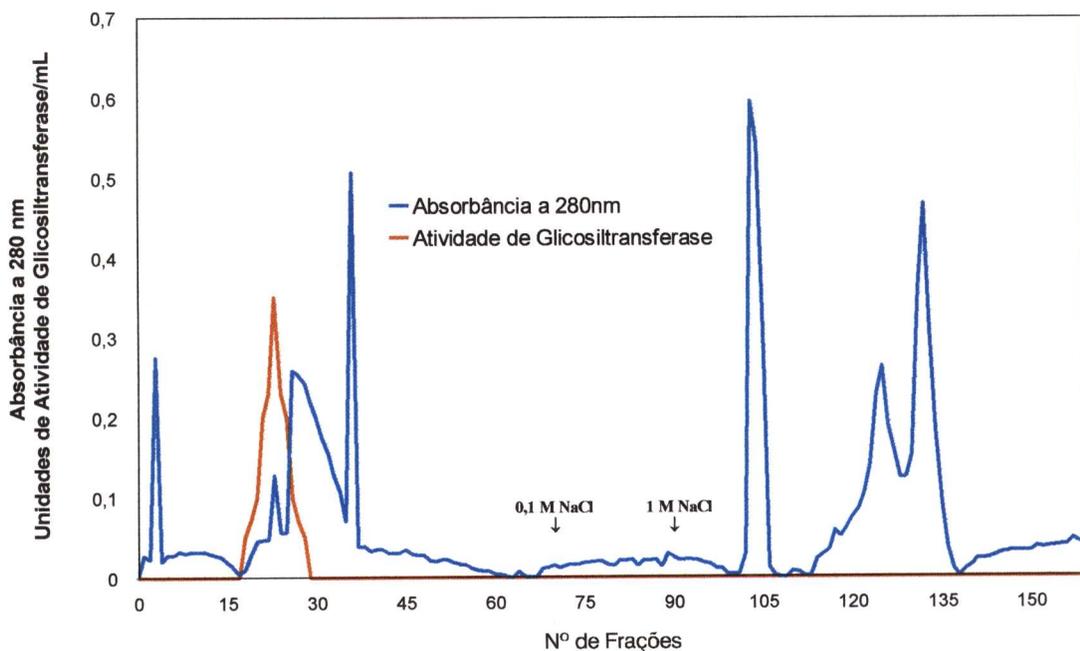


TABELA 6- PURIFICAÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE INTRACELULAR DE *Erwinia* sp. D-12

Etapa de Procedimento	Volume (ml)	Unidade/ml	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (Unidades/mg de Proteína)	Atividade Total	Purificação	Rendimento (%)
Extrato Enzimático Bruto	50	14,62	10,03	1,46	731,0	1	100
Cromatografia em Coluna de DEAE-Sephadex A-50	70	8,33	0,20	41,65	583,1	28,5	79,8
Cromatografia em Coluna de DEAE-Sephrose	55	0,99	0,05	19,80	54,5	13,5	7,5

McALLISTER et alii (1990) descreveram a extração e purificação de glicosiltransferase intracelular de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, que catalisa a síntese de isomaltulose a partir de sacarose. A enzima foi extraída pelo rompimento da massa celular com Prensa X e, o extrato foi tratado com sulfato de estreptomicina para a remoção de ácidos nucleicos. Após diálise, a enzima foi concentrada por ultrafiltração e a preparação bruta foi purificada 25 vezes através de cromatografia em CM-Bio Gel A.

UEKANE (1993) relatou que a glicosiltransferase intracelular de *Klebsiella* sp. nº18, que catalisa a conversão de sacarose em palatinose, foi purificada 12,1 vezes após fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia em colunas de DEAE-Sephadex A-50 e CM-Celulose. A glicosiltransferase purificada apresentou 0,17 unidades de atividade/mg de proteína.

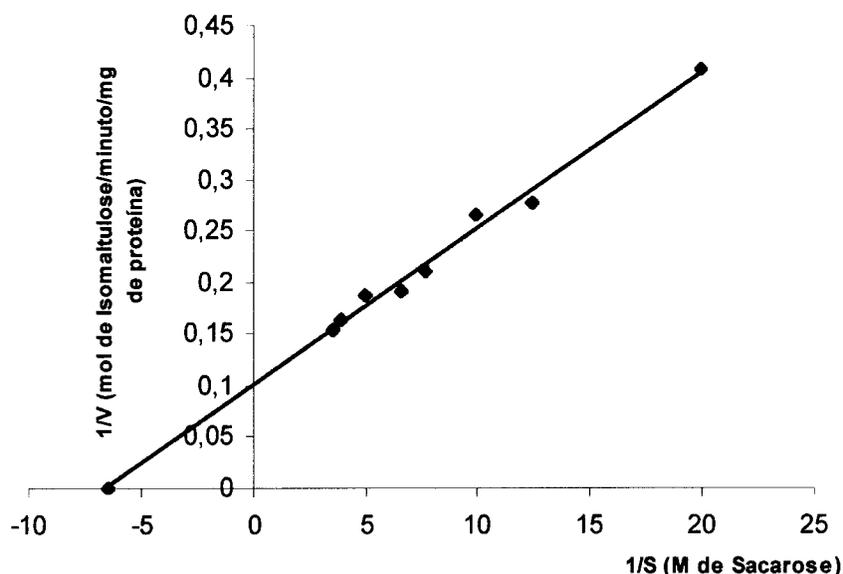
HAYASHI et alii (1994) purificaram cerca de 58,25 vezes a glicosiltransferase de *Aureobasidium* sp. ATCC 20524, que catalisa a síntese de panose e isomaltose a partir de maltose, através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em colunas de S-Sephadex, DEAE-Cellulofine A-800, Sephadex G-200 (duas vezes), com 21,5% de rendimento.

4.7. Caracterização da Glicosiltransferase Purificada Obtida da Linhagem *Erwinia* sp. D-12:

4.7.1. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática:

O efeito da concentração do substrato sacarose na atividade de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12, determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.1., está ilustrado na FIGURA 7. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934), obtendo-se os valores de 138mM de sacarose e 9,81 μ mol de isomaltulose/minuto/mg de proteína, respectivamente.

FIGURA 7- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SACAROSE NA ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE



As glicosiltransferases, que catalisam a síntese de isomaltulose a partir de sacarose, obtidas de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et alii, 1982), *Serratia plymuthica* (McALLISTER et alii, 1990) e *Klebsiella* sp. n^o18 (UEKANE, 1993) apresentaram respectivamente valores de K_m 350mM, 65,3mM e 120mM para o substrato sacarose. Estes resultados indicam que a enzima de *Erwinia* sp. D-12 apresentou menor afinidade ao substrato sacarose do que a

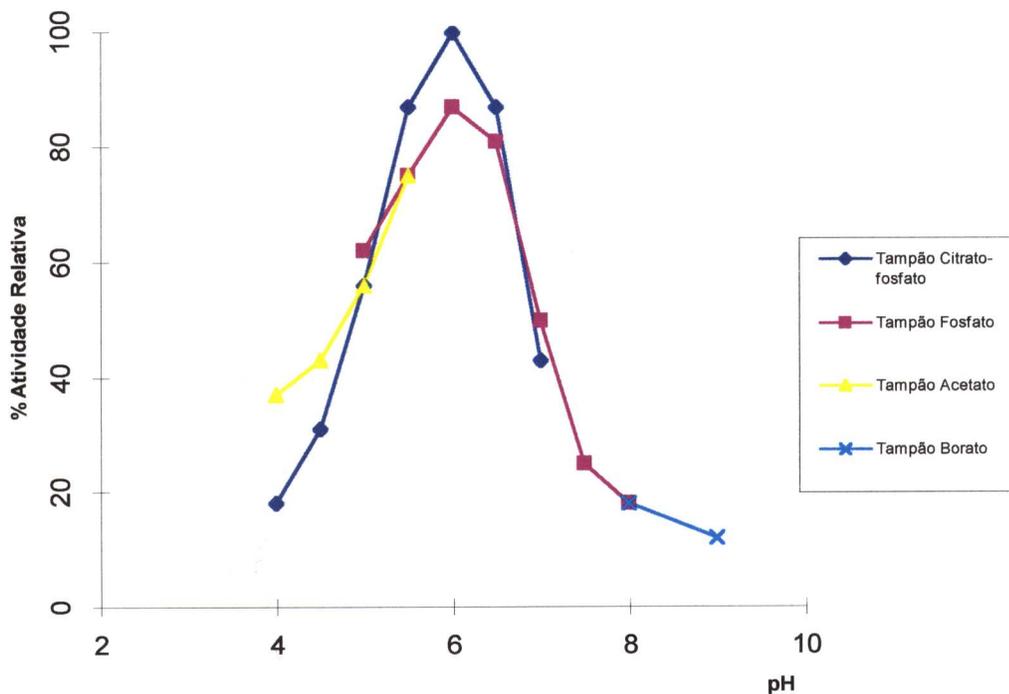
glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* e *Klebsiella* sp. n^o18, porém maior afinidade a sacarose em relação a glicosiltransferase de *Erwinia rhapontici*.

Em 1984, NAKAJIMA (citado por McALLISTER et alii, 1990) utilizando células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, produtor de glicosiltransferase, para a produção de isomaltulose a partir de sacarose, verificou que o valor de Km para o substrato sacarose foi 140mM.

4.7.2. Efeito do pH na Atividade Enzimática:

O efeito do pH na atividade de glicosiltransferase foi determinado de acordo com o item 3.2.7.2. A FIGURA 8 mostra que a enzima de *Erwinia* sp. D-12 apresentou atividade ótima no pH 6,0 em tampão citrato-fosfato ou tampão fosfato a 40°C.

FIGURA 8 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA



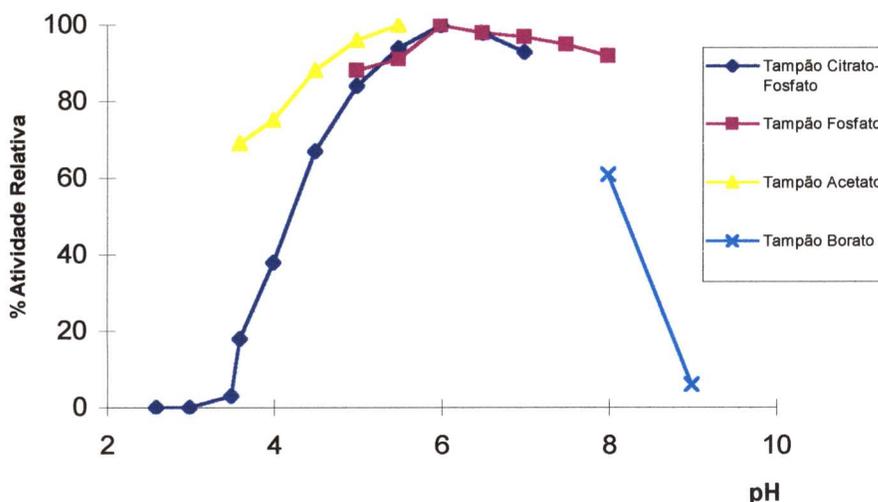
As glicosiltransferases microbianas que convertem sacarose em isomaltulose com alto rendimento, descritas na literatura, apresentam atividade ótima na faixa de pH entre 6,0 a 7,0. A glicosiltransferase de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAN et alii, 1982) apresentou atividade ótima em pH 7,0 a 30°C enquanto que a enzima glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* (McALLISTER et alii, 1990) apresentou atividade ótima em pH 6,0. A glicosiltransferase purificada de *Klebsiella* sp. n°18 descrita por UEKANE (1993) apresentou atividade ótima na faixa de pH 6,0 a 6,6 a 35°C em tampão citrato-fosfato.

A α -glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 que converte sacarose em trealulose e isomaltulose simultaneamente, apresentou atividade ótima em pH 5,8 e a 40°C (NAGAI et alii, 1994).

4.7.3. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima Purificada:

O efeito do pH na estabilidade da glicosiltransferase foi determinado de acordo com o item 3.2.7.3. A FIGURA 9 ilustra que a glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 demonstrou estabilidade máxima na faixa de pH 5,7 a 6,3 após 24 horas de incubação a 5°C.

FIGURA 9- EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA PURIFICADA



CHEETHAM et alii (1985) utilizando células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* para a produção de isomaltulose relataram que a enzima mostrou-se mais estável na faixa de pH 4,0 a 4,5.

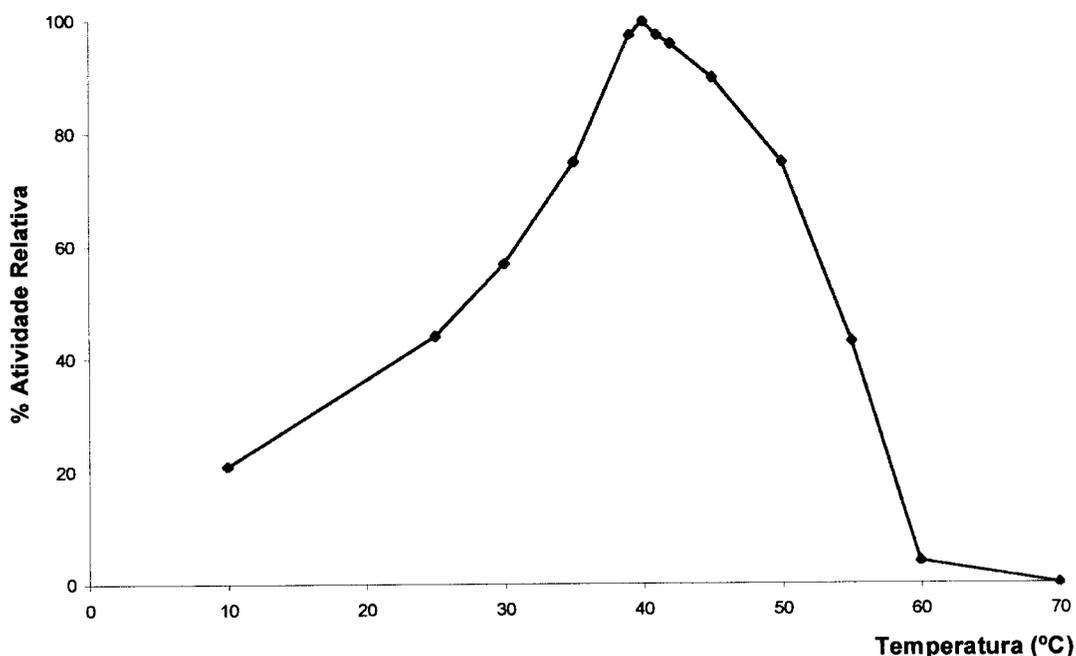
A glicosiltransferase purificada de *Klebsiella* sp. nº18, que converte sacarose em isomaltulose, apresentou-se mais estável na faixa de pH 5,5 a 6,6 em tampão citrato-fosfato, sendo inativada em pH inferiores a 4,6 após 24 horas de incubação a 5°C (UEKANE, 1993).

NAGAI et alii (1994) relataram que a α -glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 que converte sacarose em trealulose e isomaltulose simultaneamente, mostrou-se estável na faixa de pH 5,1 a 6,7 em temperaturas inferiores a 40°C.

4.7.4. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática:

O efeito da temperatura na atividade da glicosiltransferase purificada da linhagem de *Erwinia* sp. D-12 foi verificado como descrito no item 3.2.7.4. A FIGURA 10 ilustra que a glicosiltransferase purificada da linhagem *Erwinia* sp. D-12 apresentou atividade ótima a 40°C.

FIGURA 10 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

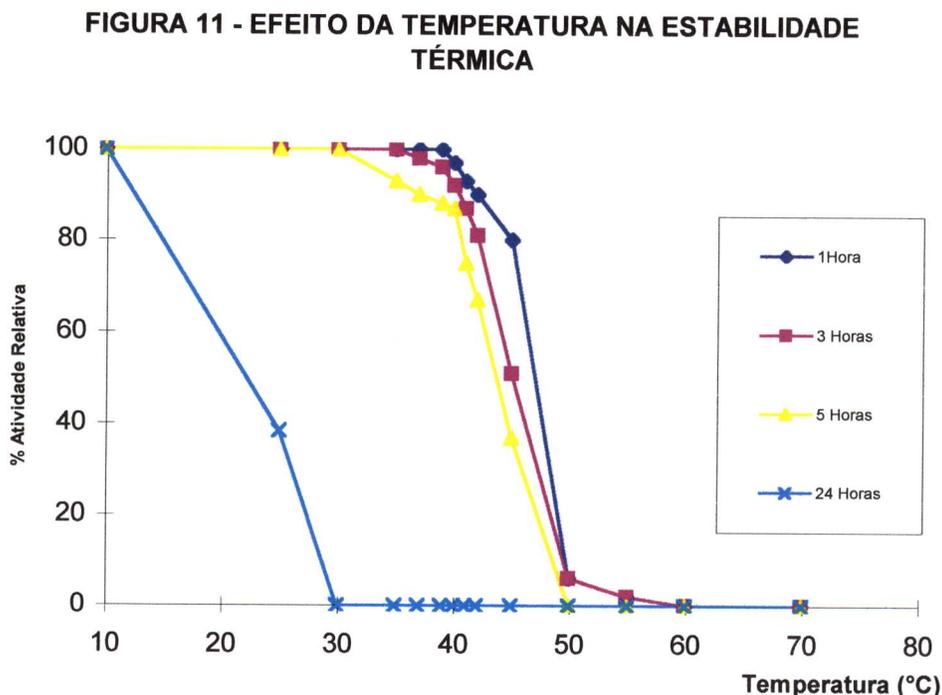


As glicosiltransferases microbianas que catalisam a conversão de sacarose em isomaltulose, descritas na literatura, apresentam atividade ótima na faixa de temperatura de 30°C - 35°C. As glicosiltransferases obtidas de *Erwinia rhapontici* (CHEETHAN et alii, 1982) e *Serratia plymuthica* (McALLISTER et alii, 1990), capazes de converter sacarose em isomaltulose com alto rendimento, apresentam atividade ótima a 30°C enquanto que a glicosiltransferase purificada de *Klebsiella* sp. n°18 estudada por UEKANE (1993) apresentou atividade ótima a 35°C.

De acordo com NAGAI et alii (1994) a α -glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 que converte sacarose em trealulose e isomaltulose simultaneamente apresenta atividade ótima a 40°C.

4.7.5. Efeito da Temperatura na Estabilidade Enzimática:

O efeito da temperatura na estabilidade da glicosiltransferase purificada foi testado de acordo com o item 3.2.7.5. A FIGURA 11 ilustra que a glicosiltransferase purificada de *Erwinia* sp. D-12 é uma enzima termosensível.



A enzima permaneceu estável após 1 hora de tratamento a 39°C e após 3 horas de tratamento a 35°C na ausência de substrato. A glicosiltransferase foi inativada em temperaturas superiores a 30°C após 5 horas de incubação na ausência de substrato. A enzima foi inativada rapidamente em temperaturas superiores a 10°C após 24 horas de incubação.

As glicosiltransferases microbianas que catalisam a conversão da sacarose em isomaltulose são enzimas termosensíveis. McALLISTER et alii (1990) relatou que a enzima glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* ATCC 15928, que converte sacarose em isomaltulose, mostrou-se estável após incubação a 30°C por duas semanas.

Segundo UEKANE (1993) foi verificado que a glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18, que converte sacarose em isomaltulose, mostrou-se termosensível sendo inativada rapidamente em temperaturas superiores a 30°C após 3 horas de incubação na ausência de substrato.

4.7.6. Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade da Glicosiltransferase:

Verificou-se que a presença de KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaCl e Na₂HAsO₄ nas concentrações 0,1mM, 1,0mM e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação não afetaram a atividade de glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12. Os sais de CoCl₂, ZnCl₂, FeCl₃ e CuSO₄ não afetaram a atividade de glicosiltransferase nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM. Na concentração de 10mM de ZnCl₂ e FeCl₃ a atividade residual da glicosiltransferase foram, respectivamente, 31,8% e 79,5%, enquanto que, nesta mesma concentração o sal CoCl₂ interferiu na metodologia de determinação de atividade de glicosiltransferase utilizada. O sal CuSO₄ na concentração final 10mM inibiu completamente a atividade da glicosiltransferase. Os sais MnCl₂ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração 0,1mM não inibiram a atividade de glicosiltransferase. Nas concentrações 1mM e 10mM de MnCl₂ a atividade residual de glicosiltransferase foi respectivamente 93,0% e 73,7% enquanto que na presença de Pb(CH₃COO)₂, nestas concentrações, a atividade residual foi 98,3% e 93,3%. O sal BaCl₂ na concentração 0,1mM não inibiu a atividade de glicosiltransferase ao passo que na concentração de 10mM o sal interferiu com a metodologia de determinação de atividade. O sal AgNO₃ inibiu cerca de 37% a atividade

de glicosiltransferase na concentração de 0,1mM e inibiu completamente nas concentrações de 1,0mM e 10mM. O sal HgCl₂ inibiu completamente a atividade da glicosiltransferase nas concentrações de 1,0mM e 10mM. O efeito de sais minerais na atividade da glicosiltransferase foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.6. A TABELA 7 ilustra os resultados.

TABELA 7- EFEITO DE SAIS MINERAIS NA ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE SOBRE O SUBSTRATO SACAROSE

SAL	% de Atividade Residual		
	0,1mM	1,0mM	10mM
KCl	100	100	100
MgSO ₄	100	100	100
CaCl ₂	100	100	100
NaCl	100	100	100
Na ₂ HAsO ₄	100	100	100
CoCl ₂	100	100	-
ZnCl ₂	100	100	31,8
FeCl ₃	100	100	79,5
CuSO ₄	100	100	0
MnCl ₂	100	93,0	73,7
Pb(CH ₃ COO) ₂	100	98,3	93,3
BaCl ₂	100	90,9	-
AgNO ₃	63,0	0	0
HgCl ₂	-	0	0

KOBAYASHI & MATSUDA (1980) verificaram que a dextranasacarase ou glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que catalisa a síntese de dextrana a partir de sacarose, foi ativada 11% por CaCl₂ (1,0mM) e inibida pelos sais de CuCl₂, FeCl₃ e MnCl₂ na concentração de 1,0mM.

UEKANE (1993) relatou que os sais de CuSO_4 , KCl , MgSO_4 , FeCl_3 e $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na concentração 1,0mM não afetaram a atividade de glicosiltransferase da linhagem de *Klebsiella* sp. n°18, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose. Os sais MnCl_2 , CaCl_2 , ZnCl_2 , BaCl_2 , CoCl_2 na concentração 1mM inibiram levemente a atividade de glicosiltransferase e, os sais HgCl_2 e AgNO_3 , nesta mesma concentração, inibiram completamente a atividade da enzima.

HAYASHI et alii (1994) relataram que a glicosiltransferase de *Aureobasidium* sp. ATCC 20524, que catalisa a síntese de panose e isomaltose a partir de maltose, foi fortemente inibida por Hg^{2+} , Ag^+ , Al^{3+} e Cu^{2+} na concentração 1mM.

4.7.7. Efeito de Inibidores na Atividade da Glicosiltransferase:

O efeito de inibidores na atividade de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.7.7. A TABELA 8 ilustra os resultados.

TABELA 8- EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE SOBRE A SACAROSE

REAGENTE	% de Atividade Residual		
	0,1mM	1,0mM	10mM
Ácido etilenodiaminotetracético	100	100	100
L-cisteína	100	100	100
Azida de sódio	100	100	92,3
Dietilditiocarbamato de sódio	100	100	71,9
p-Cloromercuribenzoato	79,8	60,7	-
N-bromosuccinimida	94,0	0	0
Iodoacetamida	-	65,5	21,3

Verificou-se que os reagentes ácido etilenodiaminotetracético e L-cisteína nas concentrações 0,1mM, 1,0mM e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação não inibiram a atividade de glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12. A atividade enzimática de glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12 não foi influenciada pela presença dos reagentes azida de sódio e dietilditiocarbamato de sódio nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM em relação ao volume final de reação. O reagente p-cloromercuribenzoato inibiu a atividade de glicosiltransferase nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM; a atividade residual na presença do inibidor foram respectivamente 79,8% e 60,7%. O p-cloromercuribenzoato na concentração de 10mM interferiu na metodologia de determinação de atividade de glicosiltransferase. O reagente N-bromosuccinimida inibiu cerca de 6% a atividade de glicosiltransferase na concentração 0,1mM e inibiu completamente a atividade de glicosiltransferase na concentração 1,0mM e 10mM em relação ao volume final de reação. A iodoacetamida inibiu a atividade de glicosiltransferase na concentração final de 1,0mM e 10mM, a atividade residual na presença do inibidor foram respectivamente 65,5% e 21,3%.

Segundo KOBAYASHI & MATSUDA (1980) a dextranasacarase ou glicosiltransferase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que catalisa a síntese de dextrana a partir de sacarose, foi inibida por EDTA (0,5mM) e ativada por CaCl₂ (1,0mM) e não sofreu inativação na presença dos reagentes p-cloromercuribenzoato e L-cisteína na concentração de 1,0mM.

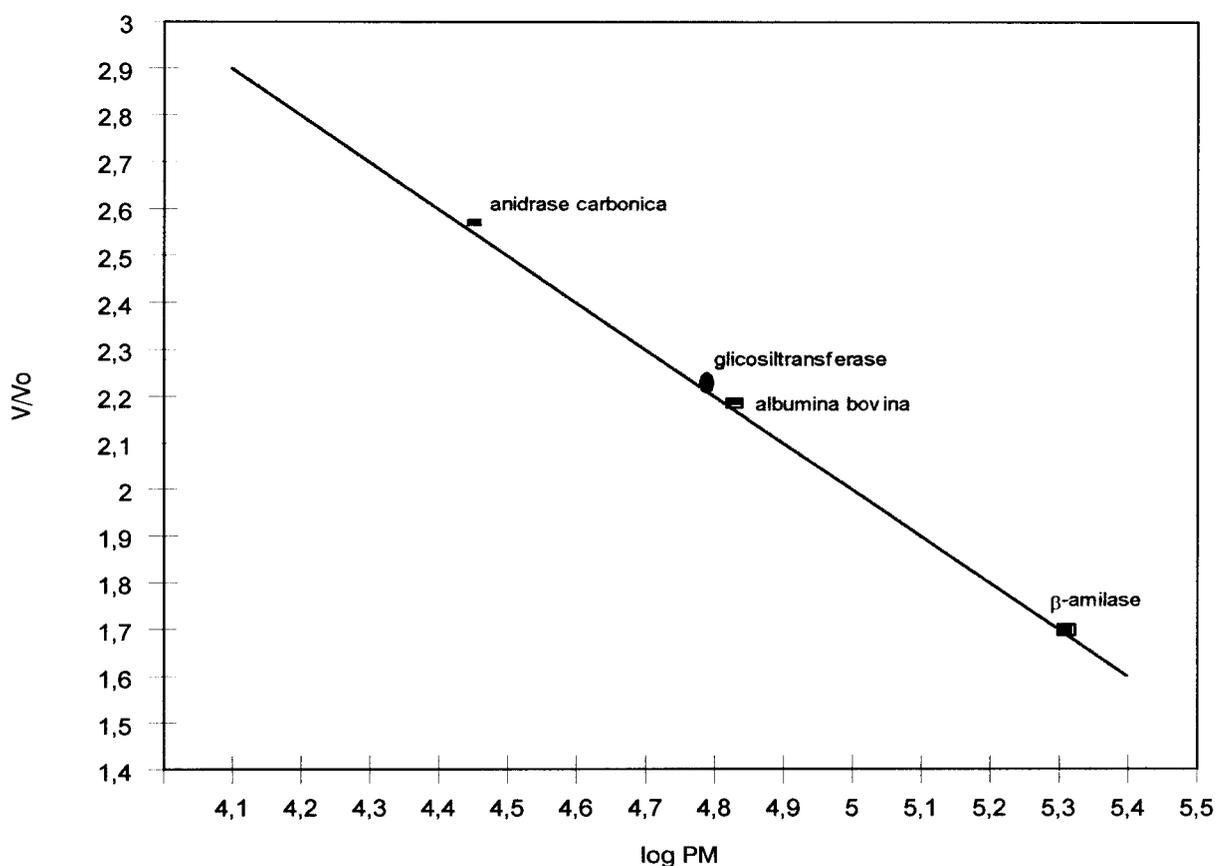
A glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18 (UEKANE, 1993), que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose, não foi afetada na presença de p-cloromercuribenzoato na concentração 0,01mM e 0,1mM e iodoacetamida na concentração de 10mM, sugerindo desta forma, a ausência de grupos sulfidrílicos essenciais para a atividade catalítica desta enzima. Da mesma forma, a atividade de glicosiltransferase não foi influenciada pelos reagentes azida de sódio, dietilditiocarbamato de sódio e L-cisteína nas concentrações de 0,1mM, 1,0mM e 10mM. O reagente ácido etilenodiaminotetracético na concentração 10mM em relação ao volume final de reação inibiu 20% da atividade da glicosiltransferase.

A glicosiltransferase de *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 que catalisa a síntese de panose e isomaltose a partir de maltose foi fortemente inibida por Hg^{2+} , Ag^+ , Al^{3+} , e Cu^{2+} na concentração 1mM. A enzima foi inibida por ácido nitriloacético, ácido monoiodoacético e arsenato de sódio.

4.7.8. Determinação do Peso Molecular da Glicosiltransferase da Linhagem *Erwinia* sp. D-12:

O peso molecular da glicosiltransferase purificada da linhagem de *Erwinia* sp. D-12 foi estimado em 63.000 daltons através da filtração em gel de Sephadex G-200 de acordo com o método descrito no item 3.2.7.8. A FIGURA 12 mostra a relação entre volume de eluição e peso molecular das proteínas em coluna de Sephadex G-200.

FIGURA 12 – DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp. D-12 ATRAVÉS DE FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX G-200.



McALLISTER et alii (1990) relataram que a enzima intracelular purificada de *Serratia plymuthica*, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose, apresentou peso molecular de 79.500 daltons, estimado por filtração em gel Sephadex G-200.

UEKANE (1993) relatou que a glicosiltransferase de *Klebsiella* sp.n°18 que converte sacarose em isomaltulose, apresentou peso molecular de 74.000 daltons, estimado através de filtração em gel de Sephadex G-200.

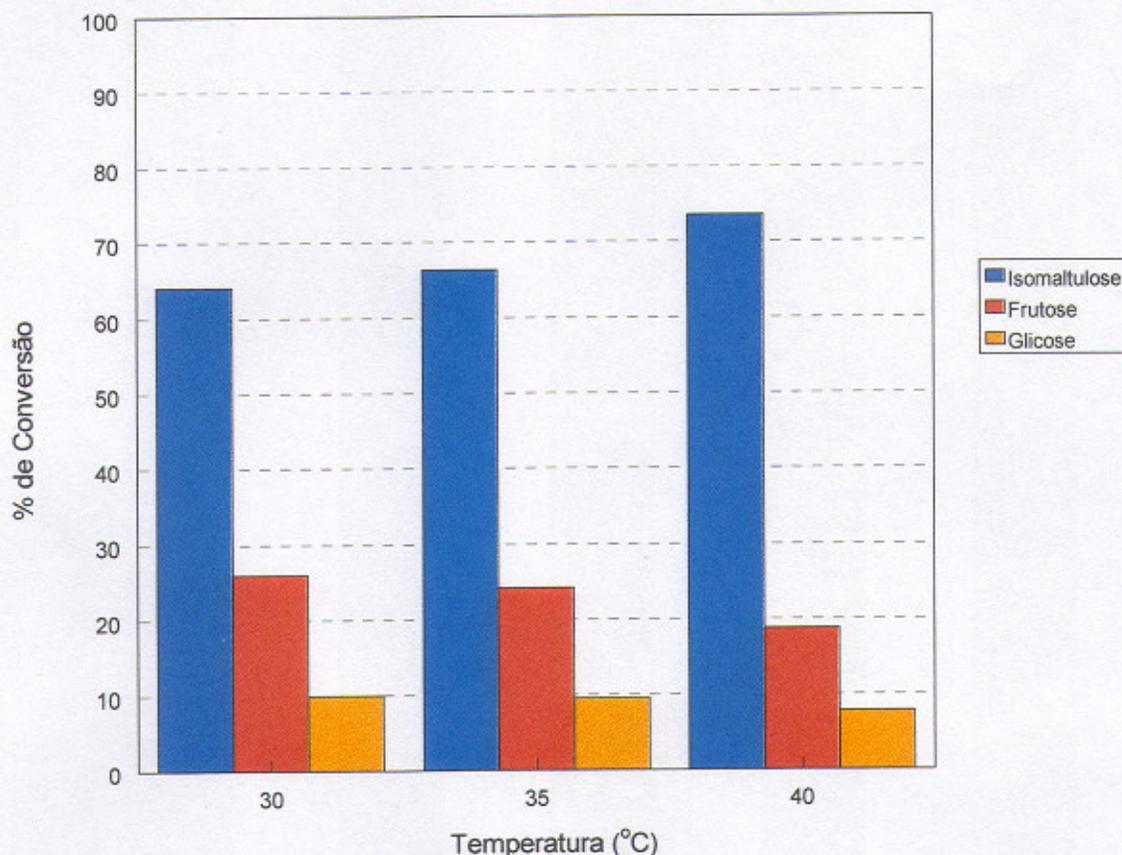
4.8. Aplicação da glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 na produção de isomaltulose a partir de sacarose:

4.8.1. Efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose:

O efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase foi realizado de acordo com o item 3.2.8.1.

A FIGURA 13 ilustra o efeito da temperatura na conversão de sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12. Foi obtido maior conversão de sacarose em isomaltulose a 40°C. Observou-se também que houve maior formação de frutose na temperatura de 30°C do que a 35°C e 40°C.

FIGURA 13 – EFEITO DA TEMPERATURA NA CONVERSÃO DE SOLUÇÃO 5% DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE PELA GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp. D-12.



4.8.2. Aplicação da glicosiltransferase a linhagem *Erwinia* sp. D-12 na produção isomaltulose a partir de sacarose a 40°C:

A aplicação da glicosiltransferase na conversão de sacarose em isomaltulose foi realizada de acordo com o item 3.2.8.2.

A TABELA 9 ilustra que foi obtido rendimento máximo de 73,5% de isomaltulose após incubação da glicosiltransferase em solução 5% de sacarose após 4 horas de reação a 40°C. Utilizando-se solução 10% de sacarose foram obtidos 72,3 % e 72,5% de isomaltulose após 4 e 8 horas de reação respectivamente.

TABELA 9. CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE PELA GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp. D-12 a 40°C

CARBOIDRATOS	TEMPO DE REAÇÃO (HORAS)						
	5% de sacarose			10% de sacarose			
	1h	2h	4h	1h	2h	4h	8h
	%			%			
ISOMALTULOSE	70,4	72,9	73,5	62,6	69,2	72,3	72,5
SACAROSE	4,2	1,8	-	14,0	6,1	1,3	-
GLICOSE	7,8	7,6	7,8	7,2	7,6	7,8	8,0
FRUTOSE	17,6	17,7	18,7	16,2	17,1	18,6	19,5

WEIDENHAGEN & LORENZ (citado por SHARPE et alii, 1960b) relataram a conversão de 90% de sacarose em isomaltulose durante um processo fermentativo por ação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*.

McALLISTER et alii (1990) utilizando a glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 obtiveram um rendimento de 85,58% e 84,97% de isomaltulose a partir de soluções 5% e 10% de sacarose, respectivamente, após uma hora de reação a 30°C, enquanto que, PARK et alii (1992) utilizando glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. n°18 obtiveram 86% de rendimento de isomaltulose a partir de 4% de sacarose após 64 horas de incubação a 25°C.

A obtenção de cerca de 80-90% de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas e altas concentrações de substrato tem sido descritas na literatura. SCHIWECK et alii (1974) descreveram a obtenção de 90% de rendimento de isomaltulose a partir de solução 20-25% de sacarose na faixa de temperatura de 20°C - 37°C utilizando células de *Protaminobacter rubrum* ou *Serratia plymuthica*. BUCKE et alii (1982) relataram a obtenção de 80-90% de rendimento de isomaltulose a partir de solução 40% de sacarose (p/v) utilizando células de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 imobilizadas em alginato de cálcio enquanto que CHEETHAN et alii (1985) obtiveram 90% de rendimento de isomaltulose utilizando solução 55% de sacarose e células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas.

- 5.7. A glicosiltransferase purificada de *Erwinia* sp. D-12 é uma enzima termosensível. A enzima foi inativada após 1 hora de tratamento a temperaturas superiores a 39°C e após 3 horas de tratamento a 35°C na ausência de substrato. A glicosiltransferase purificada foi inativada em temperaturas superiores a 30°C após 5 horas de incubação e em temperaturas superiores a 10°C após 24 horas de tratamento na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3 após 24 horas de incubação a 5 °C.
- 5.8. A atividade de glicosiltransferase não foi afetada por KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaCl e Na₂HAsO₄ nas concentrações 0,1mM, 1,0mM e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação. Os sais de CoCl₂, ZnCl₂, FeCl₃ e CuSO₄ não afetaram a atividade de glicosiltransferase nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM. Os sais MnCl₂ e Pb(CH₃COO)₂ na concentração 0,1mM não inibiram a atividade de glicosiltransferase. Nas concentrações 1,0mM e 10mM de MnCl₂ a atividade residual de glicosiltransferase foi respectivamente 93,0% e 73,7% enquanto que na presença de Pb(CH₃COO)₂, nestas concentrações, a atividade residual foi 98,3% e 93,3%. O sal BaCl₂ na concentração de 0,1mM não inibiu a atividade de glicosiltransferase. O sal AgNO₃ inibiu cerca de 37% da atividade de glicosiltransferase na concentração de 0,1mM e completamente nas concentrações de 1,0mM e 10mM. O sal HgCl₂ inibiu completamente a atividade de glicosiltransferase nas concentrações de 1,0mM e 10mM.
- 5.9. Os reagentes ácido etilenodiaminotetracético e L-cisteína nas concentrações 0,1mM, 1,0mM e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação não inibiram a atividade de glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12. A atividade enzimática de glicosiltransferase da linhagem *Erwinia* sp. D-12 não foi influenciada pela presença dos reagentes azida de sódio e dietilditiocarbamato de sódio nas concentrações de 0,1mM e 1,0mM em relação ao volume final de reação. O reagente p-cloromercuribenzoato inibiu a atividade de glicosiltransferase nas concentrações 0,1mM e 1,0mM, a atividade residual na presença do inibidor foram respectivamente 79,8% e 60,7%. O reagente N-bromosuccinimida inibiu cerca de 6% a atividade de glicosiltransferase na concentração 0,1mM e inibiu completamente a atividade de glicosiltransferase na concentração 1,0mM e

6- SUGESTÕES PARA O PRÓXIMO TRABALHO:

- Melhoramento genético da linhagem de *Erwinia* sp. D-12 visando o aumento da glicosiltransferase que converte a sacarose em isomaltulose.
- Estudo das condições ótimas de temperatura, concentração de substrato e de enzima para conversão de sacarose em isomaltulose utilizando a glicosiltransferase purificada.
- Estudo da imobilização de células ou da glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D-12 em diferentes suportes para a conversão contínua de sacarose em isomaltulose.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **The Biochemical Journal**, London, v.96, p.595-605, 1965.
- AVIGAD, G. Synthesis of glucosylfructoses by the action of yeast-glucosidase. **The Biochemical Journal**, London, v.73, p.587-593, 1959.
- BÄER, A. Sugar alcohols in the diabetic diet. In: Kretchmer, Hollenbeck, (Ed.) **Sugars and sweeteners**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1991, p.131-150.
- BENDER, H.; WALLENFELS, K. Untersuchungen an pullulan. **Biochemische Zeitschrift**, v.334, p.79-95, 1961.
- BIBBY, B. G.; FU, J. Changes in plaque pH *in vitro* by sweeteners. **Journal Dental Research**, Houston, v.64, n.9, p.1130-1133, 1985.
- BIRKHED, D.; KALFAS, S.; SVENSÄTER, G.; EDWARDSSON, S.; SWEDEN, M. Microbiological aspects of some caloric sugar substitutes. **International Dental Journal**, New York, v.35, n.1, p. 9-15, 1985.
- BOLLINGER, H. Future Ingredients - Focus of OVIFT Meeting. **Food Technology**, Chicago, v.42, p.60-64, Jan. 1988.
- BOURNE, E. J.; HUTSON, D. H.; WIGEL, H. Oligosaccharides in dextran-producing cultures of *Streptococcus bovis*. **Biochemical Journal**, London, v.79, p.549-553, 1961.

BOUTIN, R.S. Sugarless panning procedures and techniques. **Manufacturing Confectioner**, Chicago, v.72, n.5, p.72-82, 1992.

BUCHHOLZ, K. Enzymatischer aufbau von oligo-und polysacchariden aus saccharose. **Zuckerind**, Berlin, v.112, n.12, p.1059-1062, 1987.

BUCKE, C. & CHEETHAM, P. S. J. Method of reducing dental plaque formation with products for human or animal consumption using isomaltulose sucrose substitute.(1986) **U.S. Patent** 4587119.

BUCKE, C. & CHEETHAM, P. S. J. Preparation of products for human or animal consumption using a sucrose substitute. (1981a) **U. K. Patent Applic.** GB 2066639.

BUCKE, C. & CHEETHAM, P. S. J. Production of isomaltulose.(1981b) **U. K. Patent Applic.** GB 2063268.

BUCKE, C. & CHEETHAM, P. S. J. Production of isomaltulose.(1982) **U.S. Patent** 4359531.

CHEETHAM, P. S. J.; BLUNT, K. W.; BUCKE, C. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 21, p. 2155-2168, 1979a.

CHEETHAM, P. S. J. Physical studies on the mechanical stability of columns of calcium alginate gel pellets containing entrapped microbial cells. **Enzyme Microbiology Technology**, Surrey, v. 1, p. 183-188, 1979b.

CHEETHAM, P. S. J. The human sucrase-isomaltase complex: physiological, biochemical, nutritional and medical aspects. In: LEE, C.K.; LINDLEY, M.G. (Eds.) **Developments in Food Carbohydrate-3. Disaccharidases**. London and New Jersey: Applied Science Publishers Ltd., 1982a, p. 107-140.

CHEETHAM, P. S. J.; IMBER, C. E.; ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapsontici*. **Nature**, London, v.299, p.628-631, 1982b.

CHEETHAM, P. S. J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapsontici*. **Biochemical Journal**, London, v.220, p.213-220, 1984.

CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v. 27, p. 471-481, 1985.

CLARKE, M. Recent developments in chemical and microbial products from sucrose. **Sugar-y-Azucar**, Engliword, v. 84, n.3, p. 24, 26, 28, 30, 32-34, 1989.

DAHLQVIST, A. Hydrolysis of palatinose (isomaltulose) by pig intestinal glycosidases. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 15, p. 808-816, 1961.

DAHLQVIST, A.; AURICCHIO, S.; SEMENZA, G.; PRADER, A. Human intestinal disaccharidases and hereditary disaccharide intolerance. The hydrolysis of sucrose, isomaltose, palatinose (isomaltulose), and 1,6- α -oligosaccharide (isomalto-oligosaccharide) preparation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 42, n. 4, p.556-562, 1963.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. 3rd ed. London: Academic Press, 1989, p.762-834.

FINER, N. Are sweeteners really useful to diabetics? In: Grenby,T.H.(Ed.) **Progress in Sweeteners**. Barking Elsevier Science, 1989, p.215-239.

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

GRENBY, T. H. Nutritive sucrose substitutes and dental health. In: Grenby, T.H., Parker, K. J; Lindley, M.G.(Ed.). **Development in Sweeteners-2**. London, Applied Science, 1983, p.51-89.

HARTREE, E.F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response -**Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, p. 422-427, 1972.

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

HAVENAAR, R. Dental advantages of some bulk sweeteners in laboratory animal trials. In GREENBY, T.H. (Ed.). **Developments in Sweeteners -3**, London: Elsevier Applied Science, 1987, p. 189-211

HAYASHI, S., HAYASHI, T., TAKASAKI, Y., IMADA, K. Purification and Properties of glucosyltransferase from *Aureobasidium*. **Journal of Industrial Microbiology** v.13, p.5-9, 1994

IJIMA, Y.; YAMABE, R.; NAKATSUKASA, M.; OGIWARA, H. Sweetened condensed milk like composition and a method for producing it. (1990) **U. S. Patent** 4948616.

IRWIN, W. E. Isomalt - A sweet, reduced-calorie bulking agent. **Food Technology**, Chicago, v.44, n.6, p.128, 1990.

- KAWAI, K.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. **Endocrinology Japon**, v. 32, n. 6, p. 933-936, 1985.
- KHAN, R. Chemical and enzymic transformations of sucrose. **International Sugar Journal**, Glamorgan v. 96, n. 1141, p. 12-17, 1994.
- KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 614, p. 46-62, 1980.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Willians & Wilkins, v. 1, p. 408-465, 1984.
- KEYES, P. H. & JORDAN, H. V. Periodontal lesions in the Syrian Hamster-III. Findings related to an infectious and transmissible component. **Archives Oral Biology**, v. 9, p. 377-400, 1964.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 56, p. 658-666, 1934.
- LOW, N. H.; NELSON, D. L.; SPORNS, P. Carbohydrate analysis of Western Canadian honeys and their nectar sources to determine the origin of honey oligosaccharides. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 27, n. 4, p. 245-251, 1988a.
- LOW, N. H.; SPORNS, P. Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 2, p. 558-561, 1988b.

- LUND, B. M.; WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 78, p. 331-336, 1973.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980.
- MAKI, Y.; OTHA, K.; TAKAZOE, I.; MATSUKUBO, Y.; TAKAESU, Y.; TOPITSOGLOU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol, and xylitol in suspensions of human dental plaque. **Caries Research**, Basel, v. 17, p. 335-339, 1983.
- MALLETTE, M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Eds.). **Methods in Microbiology**, London, Academic Press, 1969, Vol. 1 p. 522-566,
- McALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E.; FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesizing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 12, n.9, p. 667-672, 1990.
- McDONALD, I.; DANIEL, J. W. The bio-availability of isomaltulose in man and rat. **Nutrition Reports International**, Los Altos, v. 28, n 5, p. 1083-1090, 1983.
- MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; OOSHIMA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. **Oral Microbiology Immunology**, Copenhagen, v. 5, p. 189-194, 1990.
- MIYATA, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 10, p. 1680-1681, 1992.

- NAGAI, Y.; TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n. 12, p. 2049-2053, 1993.
- NAGAI, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K. Characterization of α -glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 10, p. 1789-1793, 1994.
- NEWBRUN, E. Dental Effects of Sugars and Sweeteners. In: KRETCHNER, HOLLENBECK (Eds.). **Sugar and Sweeteners**. CRC Press, Inc. 1991
- NISIZAWA, K.; HASHIMOTO, Y. Glycoside hydrolases and glycosyl transferases. In: PIGMAN, W.; HORTON, D. (Eds.). **The Carbohydrates chemistry and biochemistry**. London: Academic Press, 1970. v. IIA, p. 241-299.
- NOLL-BORCHERS, M.; BUCHHOLZ, K. Kinetics and yields of 3-keto-isomaltulose by microbial oxidation of isomaltulose. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 15, n. 2, p. 139-144, 1993.
- OHTA, K.; TAKAZOE, I. Effect of isomaltulose on acid production and insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. **Bulletin Tokyo Dental College**, v. 24, n. 1, p. 1-11, 1983.
- OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N.; HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, Washington, v. 39, n. 1, p. 43-49, 1983a.
- OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Shinagawaku, v. 36, p. 219-223, 1983b.

- OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; TAKEI, T.; FUJIWARA, T.; SOBUE, S. Plaque formation of dietary isomaltulose in humans. **Caries Research**, Basel, v. 24, p. 48-51, 1990.
- OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; MINAMI, T.; FUJIWARA, T.; NAKAJIMA, Y.; HAMADA, S. Trehalulose does not induce dental caries in rats infected with mutans streptococci. **Caries Research**, Basel, v. 25, p. 277-282, 1991.
- PARK, Y. K.; UEKANE, R. T.; PUPIN, A. M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 14, n. 7, p. 547-551, 1992.
- PARTRIDGE, S. M. Filter-paper partition chromatography of sugars. **The Biochemical Journal**, London, v. 42, p. 238-247, 1948.
- REMAUD, S. M.; MUNGUIA, A. L.; PELENC, V.; PAUL, F.; MONSAN, P. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1 \rightarrow 2) linkages. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 44, p. 101-117, 1994.
- ROBERTS, P. G.; HAYES, M. L. Effects of 2-deoxy D-glucose and other sugar analogues on acid production from sugars by human dental plaque bacteria. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Copenhagen, v. 24, p. 201-209, 1980.
- SASAKI, N.; TOPITSOGLU, V.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49. **Swediser Dental Journal**, Stockholm, v. 9, p. 149-155, 1985.
- SCHWIMMER, S.; BEVENUE, A. Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6- linked glucosaccharides. **Science**, Washington, v. 123, p. 543-544, 1956.

- SCHIWECK, H.; STEINLE, G.; HABERL, L. (1974) *German Pat. Appl. Pub.* n° 22.17628.9.
- SCHIWECK, H.; STEINLE, G.; MÜLLER, L.; GAU, W.; MUNIR, M. (1980) *U. S. Patent* 4233439.
- SHARPE, E. S.; STODOLA, F. H.; KOEPSSELL, H. J. Formation of isomaltulose in enzymatic dextran synthesis. *The Journal of Organic Chemistry*, Washington, v. 25, p. 1062-1063, 1960.
- SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y.). *U.K. Patent Applic. GB* 2082591A., 1982b.
- SIDDIQUI, I. R.; FURGALA, B. Isolation and characterization of disaccharides from royal jelly. *Journal of Apicultural Research*, London, v. 4, p. 89-94, 1965.
- SIDDIQUI, I. R.; FURGALA, B. Isolation and characterization of oligosaccharide from honey. Part I - Disaccharides. *Journal of Apicultural Research*, London, v. 6, n3, p. 139-145, 1967.
- SNODIN, D. J. & DANIEL, J. W. The toxicology and safety evaluation of non-nutritive sweeteners. In: GRENBY, T.H.; PARKER, K.J.; LINDLEY, M.G. (Eds.). *Developments in sweeteners-2*. London: Applied Science Publishers Ltd., 1983, p. 157-178
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- STODOLA, F. H.; KOEPSSELL, H. J.; SHARPE, E. S. Ein neues von *Leuconostoc mesenteroides* gebildetes disaccharid. *Journal of American Chemical Society*, Easton, v. 74, p. 3202-3203, 1952 (Abstr. Aus Chem. Zbtl., 1953, 4376).

STODOLA, F. H.; SHARPE, E. S.; KOEPESELL, H. J. The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 78, p. 2514-2518, 1956.

STRÄTER, P. J. Palatinin* - Technological and processing characteristics. In: NABORS, L.O.; GELARDI, R.C. (Eds.). **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1986, p. 217-244.

STRÄTER, P.J. Palatinose. **Zuckerind**, v. 112, n. 10, p. 900-902, 1987.

SUGIMOTO, T. AMEMURA, A, HARADA, T. Formations of extracellular isoamylase and intracellular alpha-glucosidase and amylases(s) by *Pseudomonas* SB12 and a mutant strains. **Applied Microbiology** v.28, n.3, 336-339, 1974

TAKAZOE, I.; OHTA, K.; SHIMIZU, J.; SUSUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. Low cariogenic sweeteners **U.K. Patent Applic.** GB 2086203 A., 1982a.

TAKAZOE, I.; OHTA, K.; KADOMURA, Y.; NAKAJIMA, Y. Inibitory mechanism of isomaltulose for insoluble glucan synthesis by *Str. mutans*. **Journal Dental Research**, Houston, v. 61, p. 340, 1982b.

TAKAZOE, I.; OHTA, K.; TAKAOKA, M.; NAKAJIMA, Y. Oligosaccharides produced by *Str. mutans* GTF from sucrose with isomaltulose. **Journal Dental Research**, Houston, v. 62, p. 684, 1983.

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

- TAKAZOE, I.; FROSTELL, G.; OHTA, K.; TOPITSOGLU, V.; SASAKI, N. Palatinose - a sucrose substitute. PILOT STUDIES. **Swediser Dental Journal**, Stockholm, v. 9, p. 81-87, 1985.
- TAKAZOE, I. Palatinose - An isomeric alternative to sucrose. In: GRENBY T. H. (Ed.). **Progress in sweeteners**. Barking: Elsevier Applied Food Science Series, 1989, p. 143-167.
- TOPITSOGLU, V.; SASAKI, N.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (Palatinose) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, Basel, v. 18, p. 14-51, 1984.
- TSUYUKI, K.; SUGITANI, T.; MIYATA, Y.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of isomaltulose- and trehalulose- producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 38, p. 483-490, 1992.
- WALTER, J.; JÖRDENING, H-J. Kinetic model of disaccharide oxidation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 48, p. 12-16, 1995.
- WELSH, J. D.ROHRER, G. V.; WALKER, A. Human intestinal disaccharidase activity. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 117, p. 488-494, 1966.
- WISE, C. S.; DIMLER, R. J.; DAVIS, H. A.; RIST, C. E. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 27, p. 33-36, 1955.
- UEDA, S.; NANRI, N. Production of isoamylase by *Escherichia intermedia*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, n. 3, p. 492-496, 1967.

UEDA, S.; OHBA, R. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 36, n. 13, p. 2381-2391, 1972.

UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. Tese (Mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

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

8- ANEXO

FIGURA 1 - RELAÇÃO ABSORBÂNCIA (660nm) X MASSA CELULAR SECA (mg/ml) DA LINHAGEM D-12

