

PRODUÇÃO DE LACTOSACAROSE POR β -FRUTOFURANOSIDASE DE *Bacillus* sp n^o 417 A PARTIR DE LACTOSE E SACAROSE¹

IKEGAKI, Masaharu² & PARK, Yong Kun³

RESUMO

Entre 1341 linhagens de microrganismos isolados a partir de amostras de solos, flores e frutos e testados quanto à produção de β -frutofuranosidase com atividade de transferência para produção de lactosacarose foi selecionado uma linhagem, identificada como *Bacillus* sp n^o417. Verificou-se que após 8 horas de reação, a proporção de lactose e sacarose 1:1 (p/p) e 20% de concentração de açúcares totais, a uma temperatura de 45°C e pH 5,6 foram as melhores condições para produção de lactosacarose.

Palavras-chaves: Lactosacarose, β -frutofuranosidase, *Bacillus* sp n^o 417.

SUMMARY

LACTOSUCROSE PRODUCTION BY β -FRUCTOFUNOSIDASE FROM *Bacillus* sp n^o 417 USING LACTOSE AND SUCROSE MIXTURE. One thousand three hundred and forty one strains of microorganisms were isolated from soil, flower and fruit samples and examined for production of b-fructofuranosidase. This enzyme produces lactosucrose from mixture of lactose and sucrose. Six strains of microorganisms were selected as lactosucrose producers. Among them, one strain, identified as *Bacillus* sp n^o 417, showed high b-fructofuranosidase transfer activity to lactosucrose production. The optimum pH and temperature for lactosucrose production were 5,6 and 45°C, respectively. The best condition for the lactosucrose production were: 8 hours of reaction; a ratio lactose to sucrose of 1:1 (w/w) and a total sugar concentration of 20% (1:1, w/w).

Key words: Lactosucrose, b-fructofuranosidase, *Bacillus* sp n^o417.

1 — INTRODUÇÃO

A lactosacarose (O- β -D-galactopiranosil-(1-4)-O- α -D-glicopiranosil-(1-2)- β -D-frutofuranosídeo) ilustrada na Figura 1, é um açúcar formado pela transferência de resíduos frutossil provenientes da sacarose para a lactose catalisada pela β -frutofuranosidase (E.C. 3.2.1.26, β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase) microbianas. Este açúcar possui baixo teor calórico e também estimula o crescimento seletivo de Bifidobacterias no intestino humano (4, 10). Mantém as características físico-químicas desejáveis e doce, aproximadamente, de 30% comparada a sacarose (6).

BACON & EDELMAN (1) relataram que a sacarase (β -frutofuranosidase) de leveduras e fungos podem sintetizar oligo e heterossacarídeos pela transferência de resíduos de frutossil da sacarose para aceptores adequados.

¹ Recebido para publicação em 25/10/96. Aceito para publicação em 29/7/97.

² Parte da Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos do Primeiro Autor – Departamento de Ciência de Alimentos – FEA – UNICAMP.

³ Prof. Titular do Departamento de Ciência de Alimentos – FEA – UNICAMP. Cx. Postal 6121 CEP 13081-970.

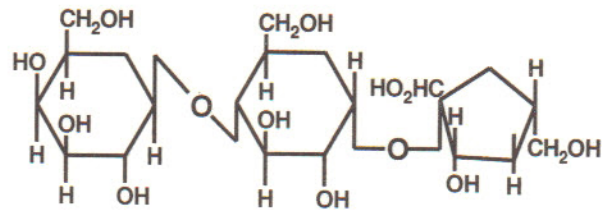


FIGURA 1. Estrutura de Lactosacarose.

HESTRIN *et al* (2) demonstraram que a transferência reversível de grupamentos frutofuranosídicos de um aldósídeo, que serve como doador, para o oxigênio do carbono anomérico de um outro aldósídeo, que atua como aceptor, foi catalisado pelo sistema enzimático da levansacarase. Conseqüentemente, FEINGOLD *et al* provaram que a levansacarase catalisou a transferência de um resíduo de frutossil proveniente da rafinose para o oxigênio do carbono anomérico da galactose sendo formado um novo dissacarídeo denominado D-galactopiranosil-D-frutofuranosídeo (galsucrose).

Vários autores reportaram a ação da β -frutofuranosidase com atividade de transferência onde os principais açúcares formados foram os frutooligosacarídeos (1-kestose, nistose e frutofuranosilnistose) (7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15). Entretanto FUJITA *et al* (5) descreveram que a β -frutofuranosidase de *Arthrobacter* sp K-1 catalisou a transfrutossilacção para diversos aceptores formando, por exemplo, frutossilxilósídeo (5) e lactossilsucrose (lactosacarose) (6).

O objetivo desse trabalho foi isolar uma nova linhagem de microrganismo que produz β -frutofuranosidase com alta atividade de transferência para produção de lactosacarose e a definição de alguns parâmetros para sua produção.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Materiais

Todos os reagentes químicos utilizados foram da marca Merck e padrão analítico de lactosacarose foi obtido da Daiichi Chemical Co. (Tokyo, Japão). Foram utilizados ainda balanças analíticas e semi-analíticas, potenciômetro, espectrofotômetro UV-Vis Beckman D-70, centrífuga refrigerada, HPLC CG-480C com detector de Índice de Refração CG-410, mesa rotativa com temperatura e agitação controlada, entre outros. Os meios de cultura utilizados foram todos das marcas Difco e Merck.

2.2 – Isolamento do Microrganismo

Foram coletadas amostras de diversas regiões do país. As amostras consistiam de solos, flores e frutos. Para as amostras de solo, foram feitas suspensões utilizando 1

grama de solo em 10ml de água destilada estéril e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura composto de 4% de sacarose, 0,4% de extrato de carne, 1% de peptona e 2% de ágar e incubados a 30°C por 24 - 48 horas. Para o isolamento de microrganismos a partir de amostras de flores e frutos, as mesmas foram inoculadas em erlenmeyer de 50ml contendo 10ml de meio de cultura de enriquecimento composto de 40% de sacarose e 1% de extrato de levedura e incubados em mesa rotatória a 200rpm, 30°C por 72 horas (9). Em seguida, o caldo de fermentação foi inoculado em placas de Petri contendo mesmo meio de cultura citado anteriormente e incubados a 30°C por 24 - 48 horas. Após a incubação, as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaios contendo mesmo meio de cultura inclinado e armazenados em geladeira.

2.3 – Seleção de Microrganismos Produtores de β -frutofuranosidase

Os microrganismos isolados foram testados quanto a produção de β -frutofuranosidase. Foram inoculados em erlenmeyer de 50ml contendo 10ml de meio de cultura composto de 4% de sacarose, 0,4% de extrato de carne e 1% de peptona e incubados em mesa rotatória a 200rpm, 30°C por 72 horas. Após incubação, o meio de cultura fermentado foi centrifugado para separar a massa celular. O sobrenadante obtido foi testado quanto a produção de β -frutofuranosidase.

2.4 – Determinação da Produção de β -frutofuranosidase por Cromatografia Descendente em Papel

Aliquotas de 10 μ l do sobrenadante dos meios de cultura obtidos de acordo com o item anterior foram aplicados em papel cromatográfico Whatman nº 1, tratado previamente com ácido bórico 0,25M. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente em papel foi acetato de etila:isopropanol:água destilada na proporção 6:3:1 (v/v), respectivamente. Os açúcares foram detectados utilizando revelador difenilamin-anilina-ácido fosfórico (16).

2.5 – Seleção de Microrganismos Produtores de Lactosacarose

Os microrganismos produtores de β -frutofuranosidase, selecionados de acordo com o item anterior foram testados quanto a produção de lactosacarose.

A mistura de 100 μ l de solução 12,75% de lactose e 100 μ l de solução 8,6% de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,02M pH 6,2 e 50 μ l do sobrenadante do meio de cultura fermentado foi incubado a 40°C por 4 horas. Após a incubação, a reação foi paralizada em banho-maria em ebulição por 10 minutos. A produção de lactosacarose foi verificada qualitativamente e quantitativamente por cromatografia descendente em papel e HPLC, respectivamente.

2.6 – Cromatografia Descendente em Papel

A determinação da produção de lactosacarose por cromatografia descendente em papel foi realizada em papel cromatográfico Whatman nº 1, tratado previamente com ácido bórico 0,25M, sendo os açúcares detectados por

revelador anilina-difenilamina-ácido fosfórico (16). O sistema de solvente utilizado para o seu desenvolvimento foi butanol:piridina:água (6:4:3, v/v) (6).

2.7 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para análise quantitativa dos açúcares utilizou-se HPLC com coluna Shodex Ionpak KS-802 e detector de índice de refração, sendo a fase móvel água com fluxo de 1ml/minuto. Utilizou-se como açúcares padrões glicose, frutose, sacarose, lactose e lactosacarose.

2.8 – Produção de Lactosacarose

Utilizando o microrganismo selecionado no item anterior foram estudados alguns fatores que influenciam a produção de lactosacarose. Para realização deste estudo, utilizou-se como substrato uma mistura de lactose e sacarose mais a solução de enzima bruta obtida a partir do sobrenadante do caldo de fermentação. Os ensaios foram realizados variando-se o pH, a temperatura, tempo de reação, proporção e a concentração dos substratos.

2.9 – Determinação da Atividade da β -frutofuranosidase

Para determinar a atividade de β -frutofuranosidase, 0,9ml de solução 20% de açúcares totais (10% de sacarose e 10% de lactose) em tampão citrato-fosfato 0,02M pH 5,6 e 0,1ml de enzima foi misturada e incubada a 45°C por 1 hora e a concentração de lactosacarose foi determinada por HPLC de acordo com o item 2.7. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de lactosacarose/minuto/ml de enzima.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 1341 linhagens a partir de diversas amostras de diferentes regiões do país sendo 409 linhagens selecionadas como produtoras de β -frutofuranosidase. Entre elas, 356 linhagens foram selecionadas como produtoras β -frutofuranosidase com atividade de hidrólise sobre a sacarose formando como produto glicose e frutose e 53 linhagens como sendo produtoras de β -frutofuranosidase com atividade de transferência tendo como produto frutooligosacarídeos, principalmente 1-kestose, nistose e frutofuranosilnístose.

A β -frutofuranosidase possui dois tipos de atividades. Uma delas é a de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose e a outra é a de transferir a molécula de frutose (proveniente da sacarose) para um aceptor, no caso outro açúcar, podendo ser a xilose, a lactose, a sacarose, etc (5).

Das 53 linhagens selecionadas como produtoras de β -frutofuranosidase com atividade de transferência, 6 linhagens foram selecionadas como produtoras de lactosacarose a partir de lactose e sacarose, das quais uma apresentou alta capacidade de produção do açúcar. Após testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos o microrganismo foi identificado como *Bacillus* sp nº 417.

Selecionado o microrganismo, foram realizados testes para verificar as melhores condições para produção de lactosacarose a partir de lactose e sacarose catalisada pela enzima β -frutofuranosidase.

De acordo com a *Figura 2*, que expressa a concentração de lactosacarose formada em função dos diferentes valores de pH, observou-se que o pH ótimo na produção de lactosacarose foi de 5,6 em tampão citrato-fosfato 0,02M.

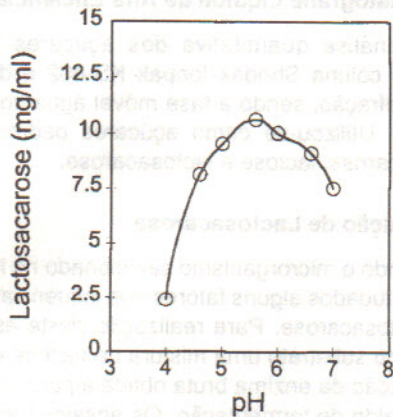


FIGURA 2. Efeito do pH na Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Formado de 12,7% de Lactose 8,6% de Sacarose a 45°C por 2 Horas de Incubação.

Da mesma forma, a *Figura 3* apresenta o efeito da temperatura na produção de lactosacarose onde expressa a concentração de lactosacarose formada em função da temperatura. A temperatura ótima para produção de lactosacarose catalisada pela β -frutofuranosidase da linhagem *Bacillus* sp n^o417 foi de 45°C.

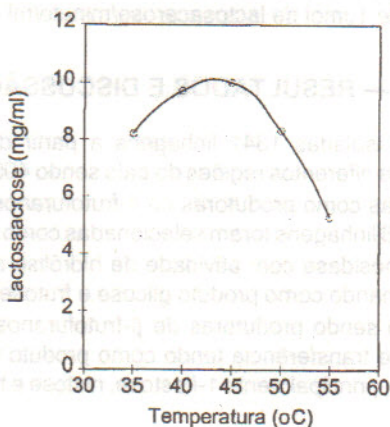


FIGURA 3. Efeito da Temperatura na Produção de Lactosacarose em Sistema de Reação Formada de 12,7% de Lactose e 8,6% de Sacarose em Tampão Citrato-Fosfato pH 5,6 0,02M.

Levando em consideração a importância do tempo de formação de lactosacarose, realizou-se o estudo da cinética de produção de lactosacarose onde incubou-se uma mistura de reação composta de lactose e sacarose em tampão citrato-fosfato 0,02M pH 5,6 a 45°C e retirou-se alíquotas em intervalos de tempos variados. Como pode ser observado na *Figura 4*, a máxima produção de lactosacarose catalisada pela enzima β -frutofuranosidase foi obtida após 8 horas de reação.

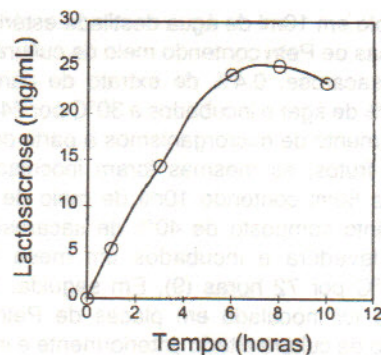


FIGURA 4. Cinética de Formação de Lactosacarose em Sistema de Reação Constituído de Solução 12,7% de Lactose e 8,6% de Sacarose incubados a 45°C.

A *Figura 5* mostra a produção de lactosacarose em função de diferentes proporções de lactose e sacarose. A proporção que apresentou maior produção de lactosacarose foi na relação 1:1 (p/p) onde se obteve 17,75 mg/mL de lactosacarose em função das diferentes proporções de lactose e sacarose, verificou-se que quanto maior a proporção de lactose (acceptor) há um aumento na porcentagem de transferência e uma diminuição na produção de lactosacarose. Isso se deve ao fato de que havendo uma grande quantidade de acceptor há um maior grau de transferência de resíduos de frutossil para este acceptor, mas devido a baixa concentração de sacarose (doador) este último se torna escasso rapidamente, acarretando numa menor formação de lactosacarose. O mesmo resultado foi obtido quando ocorre a situação inversa, onde há um aumento da proporção de sacarose (doador) e uma diminuição da lactose (acceptor), mas nesse caso, há uma diminuição na porcentagem de transferência já que a concentração do acceptor é baixa. O melhor resultado se observou quando quantidades equivalentes de lactose e sacarose foram utilizadas pois, nesse caso, não havia excesso de acceptor nem de doador que levasse a uma diminuição na formação de lactosacarose.

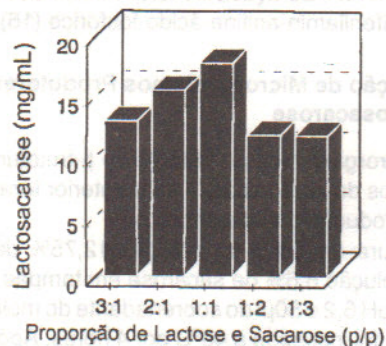


FIGURA 5. Efeito das Diferentes Proporções de Lactose e Sacarose na Produção de Lactosacarose.

A *Figura 6* ilustra a produção de lactosacarose em função da concentração de açúcares totais (lactose:sacarose 1:1, p/p) em diferentes temperaturas. Verificou-se que houve maior formação de lactosacarose a medida que aumentava a concentração de açúcares totais.

Contudo, quando se tratou de rendimento de lactosacarose (*Figura 7*) a concentração de 20% apresentou melhor

resultado a 45°C atingindo 54% de conversão. Nas demais concentrações foram obtidos resultados satisfatórios alcançando valores entre 47-50% de conversão tendo como base a sacarose a 45°C. Nas demais temperaturas (50 e 55°C) a formação de lactosacarose diminuiu consideravelmente, principalmente a 55°C.

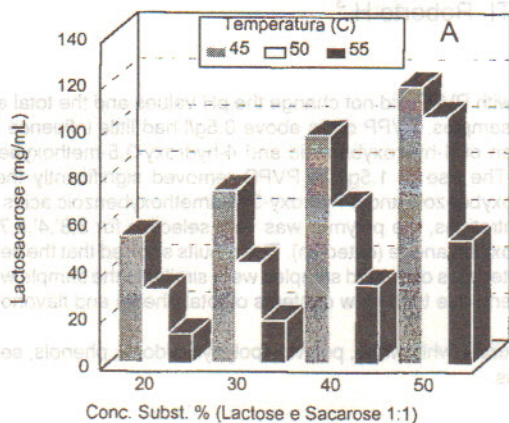


FIGURA 6. Efeito da Concentração de Açúcares Totais em Diferentes Temperatura na Produção de Lactosacarose Com Proporção de Lactose e Sacarose de 1:1 (p/p).

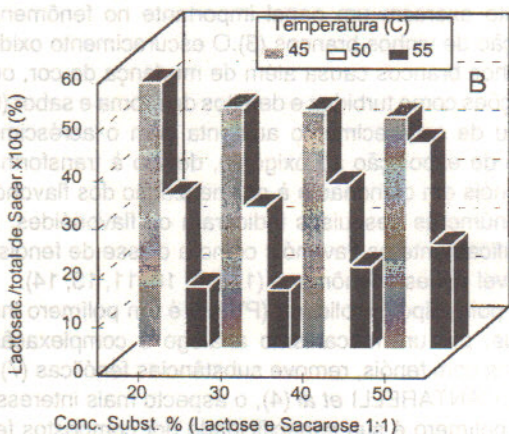


FIGURA 7. Efeito da Concentração de Açúcares Totais em Diferentes Temperatura na Porcentagem de Conversão para Lactosacarose Tendo como Base a Sacarose.

4 — CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a β -fructofuranosidase da linhagem *Bacillus* sp nº 417 apresentou tanto atividade hidrolítica sobre a sacarose quanto de transferência e na presença do acceptor lactose catalisou a formação de lactosacarose. A enzima bruta apresentou atividade ótima de pH e temperatura de 5,6 e 45°C, respectivamente.
- Na produção de lactosacarose verificou-se que após 8 horas de reação, com 20% de concentração de açúcares totais na proporção de lactose e sacarose de 1:1 (p/p) incubados a uma temperatura de 45°C em pH 5,6 obteve-se a maior produção de lactosacarose.

5 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BACON, J. S. D. & EDELMAN, J. The action of invertase preparation. *Arch. Biochem.*, 28, 467-4668, 1950.
- (2) HESTRIN, S.; FEINGOLD, D. & AVIGAD, G. Synthesis of sucrose and other β -D-fructofuranosyl aldoses by levansucrase. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 6710, 1955.
- (3) FEINGOLD, D.; AVIGAD, G. & HESTRIN, S. Enzymatic synthesis of a sucrose isomer α -D-galactopiranosyl- β -D-fructofuranoside. *J. Biol. Chem.*, 224, 295-307, 1957.
- (4) FUJITA, K.; HARA, K.; SAKAI, S.; *et al.* Effect of 4G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) on intestinal flora and its digestibility in human. *Denpun Kagaku*, 38(3):249-255, 1991.
- (5) FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosilation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric. Biol. Chem.*, 54(10):2655-2661, 1990.
- (6) FUJITA, K.; KITAHATA, S. Production of lactosucrose by β -fructofuranosidase and some of its physical properties. *Denpun Kagaku*, 38(1):1-7, 1991.
- (7) HAYASHI, S.; NONOGUCHI, M.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. *J. Ind. Microbiol.*, 7, 251-256, 1991.
- (8) HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20661. *Agric. Biol. Chem.*, 52(5):1181-1187, 1988.
- (9) OLIVEIRA, I.M.A & PARK, Y.K. Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms for production of fructooligosaccharides and studies of some enzyme properties. *Rev. Microbiol.* 26(2):125-129, 1995.
- (10) OZAKI, Y. Increasing production of Bifidobacterium by sugars. *New Food Industry*, 3(9):12-15, 1991.
- (11) PARK, Y.K.; ALMEIDA, M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 331-334, 1991.
- (12) PARK, Y.K.; OLIVEIRA, I.M.A.; IKEGAKI, M.; YIM, D.K. Production of fructooligosaccharides from sucrose by β -fructofuranosidase from new strain of yeast. In: *IFT Annual Meeting*, 1995 Anaheim, California, USA. Abstract.
- (13) PARK, Y.K.; YIM, D.K.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H. Conversion of sucrose to kestose by yeast β -fructofuranosidase. In: *Proceedings of the Seventh European Conference on Food Chemistry*. Valencia, Spain, 1993. p.223-228.
- (14) PARK, Y.K.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. & ALMEIDA, M.M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by fungal fructosyltransferase. In: *IFT Annual Meeting*, 1990, Anaheim, California, USA. Abstract.
- (15) PARK, Y.K.; YIM, D.K.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H. Production of kestose from sucrose by yeast β -fructofuranosidase. In: *IFT Annual meeting*, 1994, Atlanta, Georgia, USA. Abstract.
- (16) SCHWIMMER, S.; BEVENUE, A. Reagent for differentiation of 1,4- and 1,6-linked glucosaccharides. *Science*, 123, 543-543, 1956.