

PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE A PARTIR DA TRANSFORMAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE, UTILIZANDO-SE *Erwinia* sp D12 IMOBILIZADA COM ALGINATO DE CÁLCIO¹

Ana Lúcia Leite MORAES^{2,*}, Cláudia STECKELBERG³, Hélia Harumi SATO⁴, Andreлина PINHEIRO⁵

RESUMO

A glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 é capaz de converter a sacarose em isomaltulose (6- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose), um açúcar alternativo que apresenta baixo potencial cariogênico, e que pode ser utilizado em chocolates, gomas de mascar e balas. A isomaltulose é também utilizada na produção de isomalte, uma mistura de açúcar álcool, de baixo valor calórico e baixo potencial cariogênico. No estudo da influência dos componentes do meio de cultivo, na produção de glicosiltransferase, em frascos agitados, foi obtido maior atividade da enzima (12,8 unidades de atividade/mL do meio de cultura) em meio de cultura A constituído de melão 12% (p/v) de sólidos solúveis totais, peptona 4% (p/v) e extrato de carne 0,4% (p/v). No estudo do efeito do tempo e da temperatura na fermentação da linhagem de *Erwinia* sp D12, em fermentador New Brunswick de 3L, contendo meio de cultura A, foi obtida maior atividade de glicosiltransferase (15,6 unidades de atividade/mL de meio de cultura) na fase exponencial de crescimento após 8 horas de fermentação a 30°C. Na produção de isomaltulose a partir da sacarose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio, estudou-se o efeito da temperatura (25 – 35°C) e da concentração de substrato (12,5 – 60% p/v). Foi obtido um rendimento em torno de 50% de isomaltulose, com soluções de sacarose entre 20-30% (p/v) a 35°C. Concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40% p/v) afetaram a atividade da célula imobilizada, diminuindo a conversão de sacarose em isomaltulose. O xarope de isomaltulose foi purificado através de cromatografia de troca iônica e o eluato cristalizado por abaixamento de temperatura. Os cristais apresentaram 91,39% de isomaltulose.

Palavras-chave: isomaltulose; glicosiltransferase; *Erwinia* sp D12; imobilização celular.

SUMMARY

PRODUCTION OF ISOMALTULOSE FROM ENZYMATIC TRANSFORMATION OF SUCROSE, USING *Erwinia* sp D12 IMMOBILIZED WITH CALCIUM ALGINATE. The glucosyltransferase of *Erwinia* sp D12 is able to convert sucrose into isomaltulose (6- α -D-glucopyranosyl-D-fructofuranose), an alternative sugar which presents low cariogenic potential, and can be used to produce chocolate, chewing gum and candy. The isomaltulose is also used to produce isomalt, a mixture of alcohol-sugar with a low caloric value and low cariogenicity power. In the study of the influence of the components of the culture medium in the glucosyltransferase production in flasks under shaking conditions, the highest activity (12.8 units of activity /mL of culture medium) was obtained in culture medium A, containing molasses 12% (p/v) of the total soluble solid, peptone 4% (p/v) and meat extract 0,4% (p/v). In the study of the effects of time and temperature on the fermentation of *Erwinia* sp D12 in a 3L New Brunswick fermentor containing culture medium A. the highest glucosyltransferase activity (15.6 units of activity /mL of culture medium) was obtained during the exponential growth phase after 8 hours of fermentation at 30°C. In the production of isomaltulose from enzymatic transformation of sucrose by *Erwinia* sp D12 cells immobilized in calcium alginate, the effects of the temperature (25–35°C) and substrate concentration (12,5–60%) were evaluated, the yield of isomaltulose was approximately 50%, from sucrose solutions ranging from 20 to 30% at 35°C. Excess of sucrose affected the activity of the immobilized cell, decreasing conversion of sucrose into isomaltulose. The syrup obtained was purified through Ion Exchange Chromatography, and the crystallization of eluent by the decreasing temperature. The obtained crystals presented 91,39% of isomaltulose.

Keywords: isomaltulose; glucosyltransferase; *Erwinia* sp; Cells Immobilization.

1 – INTRODUÇÃO

Através de métodos biotecnológicos e enzimáticos é possível obter monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos derivados da sacarose, de importância para a indústria de alimentos e farmacêutica. Uma das transformações possíveis consiste na conversão da sacarose em isomaltulose através do uso de glicosiltransferase microbiana [12].

A isomaltulose (6- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose) é um dissacarídeo redutor, isômero estrutural da sacarose (2- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose), encontrado naturalmente no mel e no caldo de cana-de-açúcar. A isomaltulose, também conhecida como palatinose, possui um sabor adocicado suave e propriedades físicas e organolépticas muito similares às da sacarose. A solubilidade da isomaltulose é aproximadamente a metade da sacarose, o que facilita a sua separação na etapa de cristalização [11].

Devido ao baixo potencial cariogênico, a isomaltulose é utilizada comercialmente na produção de doces e gomas de mascar. A cárie dentária é a mais prevalente doença entre a população humana civilizada. A microbiota oral é constituída de microrganismos que geram ácidos através da degradação de carboidratos, levando a formação das cáries. A produção de ácidos pelo *Streptococcus mutans* é menor a partir de isomaltulose, quando comparado com a utilização da sacarose. A isomaltulose é também empregada na produção de isomalte, um açúcar-álcool formado por quantidades equimolares de dois isômeros

¹ Recebido para publicação em 10/09/1996. Aceito para publicação em 01/02/2005 (001141).

² Departamento de Farmácia e Nutrição/ UNIFENAS. CEP 37130-000, Alfenas, MG. E-mail aleitemoraes@ioli.com.br ou aleitemoraes@redealfenas.com.br

³ Centro Pluridisciplinar de Pesquisas, Químicas, Biológicas e Agrícolas. CPQBA-UNICAMP. CEP 13081-970- Email claudia@cpqba.unicamp.br

⁴ Laboratório de Bioquímica de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos / FEA-UNICAMP. Cidade Universitária Zeferino Vaz- Caixa Postal 6121- Barão Geraldo – Campinas / SP Brasil. CEP 13083-862- Email heliah@fea.unicamp.br

⁵ Engenharia de Alimentos/ FEA-UNICAMP. Email lia_pinheiro@yahoo.com.br.

* A quem a correspondência deve ser enviada.

[α -D-glicopiranosil 1,6 manitol (GPM) + α -D-glicopiranosil 1,6 sorbitol (GPS)], de baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixa higroscopicidade, utilizado em produtos dietéticos e formulações farmacêuticas [16].

A isomaltulose apresenta também uma grande aplicação industrial na obtenção de polímeros e surfactantes, representando uma fonte alternativa de produção destes compostos, pois atualmente os mesmos são produzidos pela indústria petroquímica, gerando riscos de contaminação ambiental [13]. Uma outra aplicação da isomaltulose consiste na obtenção de oligômeros de isomaltulose (IBOs), que atuam como prebióticos, estimulando a proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal [10].

Existem várias linhagens de microrganismos descritas na literatura que promovem a conversão de sacarose em isomaltulose através da enzima glicosiltransferase, sendo que o primeiro registro foi do *Protaminobacter rubrum* em 1958 (Weidenhagen & Lorenz, citados por SHARPE, STODOLA & KOESELL) [17].

Os microrganismos têm sido utilizados como biocatalisadores para obtenção de determinadas substâncias, uma vez que possuem grande poder de multiplicação e de adaptação às variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com o suprimento ou a carência de nutrientes do meio, o que permite uma ampla flexibilidade em sua utilização [6].

Tendo em vista a ampliação das vantagens do emprego de células como biocatalisadores, têm-se estudado meios de se dispor os microrganismos em uma forma insolúvel ao substrato, ou seja, imobilizados em um suporte sólido. A imobilização é um procedimento vantajoso, pois permite o uso contínuo das células, previne contaminações de produtos com as células, estabiliza a biocatálise e mantém as células igualmente distribuídas no reator de maneira que cada molécula de enzima é provida com igual suprimento do substrato [6].

O trabalho teve como objetivo o estudo da produção de glicosiltransferase pela *Erwinia* sp D12 e a aplicação do microrganismo na conversão da sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas em alginato de cálcio.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Estudo da produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

2.1.1 - Efeito da concentração de sacarose ou de melaço e de peptona do meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Para verificar a influência da concentração de sacarose ou de melaço do meio de cultura na produção de glicosiltransferase, foram utilizados meios de cultura constituídos de peptona 1% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v) e concentrações de sacarose 0-10% (p/v) ou de melaço 0-10% (p/v) de sólidos solúveis totais e, poste-

riormente, concentrações de melaço variando de 0 a 20% (p/v) de sólidos solúveis totais. Os frascos Erlenmeyer de 50mL contendo 10mL de meio de cultura foram inoculados com 1mL de cultura de 15 horas ($2,38 \times 10^{10}$ UFC/mL). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200rpm a 30°C por 6, 15 e 24 horas.

No estudo da influência da concentração de peptona, foram utilizados meios de cultura constituídos de melaço 12% (p/v) de sólidos solúveis totais, extrato de carne 0,4% (p/v) e concentrações de peptona variáveis entre 0 a 10% (p/v). Os frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 30mL de meio de cultura foram inoculados com 3mL de cultura de 15 horas ($2,38 \times 10^{10}$ UFC/mL) do microrganismo *Erwinia* sp D12. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200rpm a 30°C por 15 horas. Para a extração da glicosiltransferase intracelular, foram usados 10mL de meio de fermentação, o qual foi centrifugado a 11.000 x g, por 15 minutos, a 5°C. As células obtidas foram lavadas duas vezes com água destilada e, ressuspendidas, em 20mL de tampão citrato-fosfato 0,05M e pH 6,0. Posteriormente, a suspensão celular foi resfriada a 5°C, submetida ao rompimento por ultra-som durante 20 segundos a 60Hz, 200W, centrifugada a 11.000 x g durante 15 minutos a 5°C e a atividade de glicosiltransferase foi determinada no sobrenadante.

2.1.2 - Determinação da atividade de glicosiltransferase

A atividade de glicosiltransferase foi determinada através do aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose, como descrito por NAGAI-MIYATA et al. [15] e UEKANE [20], com modificações. A mistura de 450 μ L da solução de sacarose 4% (p/v) em tampão citrato-fosfato 0,05M pH6,0 e 50 μ L de solução enzimática foi incubada a 35°C por 20 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de SOMOGYI-NELSON [18], utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro, utilizou-se um "branco" substituindo 50 μ L de amostra por 50 μ L de água destilada na mistura de reação. Este teste foi realizado em triplicata. Uma unidade de atividade (UA) de glicosiltransferase foi definida como a quantidade de enzima que libera um μ mol de isomaltulose/minuto/mL do extrato enzimático a partir de sacarose sob as mesmas condições do ensaio.

2.1.3 - Estudo da influência do tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, a 28°C, 30°C e a 32°C

O cultivo foi realizado em fermentador New Brunswick Bioflo II de 3 litros, ao qual adicionou-se assepticamente 200mL do inóculo, preparado pelo cultivo do microrganismo em 2 frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio de cultivo A ($1,11 \times 10^{10}$ UFC/mL) constituído de peptona 4% (p/v), extrato de carne 0,4% (p/v) e de melaço 12% (p/v) de sólidos solúveis totais durante 8 horas em agitador rotatório a 200rpm e 30°C, ao frasco de cultura contendo 1.800mL de meio de cultivo A previamente esterilizado em autoclave. O cultivo foi realiza-

do a 28°C, 30°C e a 32°C, mantendo-se aeração de 1vvm (volume de ar/volume de meio de cultivo/minuto) e agitação de 200rpm. Foram retiradas amostras de 20mL de meio de cultura de 2 em 2 horas durante 24 horas e, posteriormente, as amostras de 36 e 48 horas de fermentação para a determinação dos parâmetros: pH do meio de cultura, crescimento celular (g massa celular seca/L) e atividade de glicosiltransferase.

2.2 – Imobilização da massa celular

Para a obtenção da massa celular a linhagem *Erwinia* sp D12 foi cultivada em fermentador de 3 L, em meio de cultivo A, durante 8 horas a 30°C como descrito anteriormente. Após fermentação, a massa celular foi recuperada por centrifugação a 11.000 x g durante 15 minutos a 5°C e lavada três vezes em condições assépticas, com água destilada esterilizada. Uma suspensão contendo 20% (p/v) de células úmidas foi misturada com uma solução 1% (p/v) de alginato de sódio (Sigma), de alta viscosidade contendo 0,1% (v/v) de *Tween 80* na proporção de volume de 1:2 (v:v). A mistura foi homogeneizada com agitador magnético e gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica, em uma solução 2% (p/v) de cloreto de cálcio para formar pequenas esferas de 3mm de diâmetro, que foram mantidas imersas na mesma solução por 24 horas em temperatura de geladeira (5°C). Antes de serem utilizadas, as esferas foram lavadas com água destilada, para a remoção do excesso de cloreto de cálcio. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.

2.3 – Estudo da produção de isomaltulose

2.3.1 – Efeito da concentração do substrato e da temperatura na transformação enzimática da sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp

Amostras de 40g de células imobilizadas foram transferidas para colunas encamisadas (20cm de comprimento x 2,5cm de diâmetro). Foram testadas soluções de sacarose na faixa de 12,5 a 60% (p/v) e temperaturas na faixa de 25° a 35°C. As soluções de sacarose foram injetadas no sentido ascendente numa vazão de 21,88mL/h. A conversão de sacarose para isomaltulose foi acompanhada durante 24 horas. Posteriormente, foi testada a conversão de sacarose em isomaltulose nas temperaturas de 35°C a 40°C, utilizando-se concentrações de sacarose na faixa de 20 a 30% (p/v), na qual verificou-se um rendimento satisfatório de isomaltulose.

• Determinação da conversão de sacarose em isomaltulose

As análises dos carboidratos foram realizadas através de cromatografia líquida de troca iônica de alta eficiência, utilizando-se um cromatógrafo líquido Dionex DX 300, contendo uma coluna carbo Pac PA1 (250 x 4mm) e integrador Dionex 4400. A fase móvel consistia de hidróxido de sódio 150mM degaseificado com hélio

e, foi utilizada a uma vazão de 1mL/minuto em temperatura ambiente. As amostras foram identificadas, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose. Os açúcares analisados apresentaram os seguintes tempos de retenção, em minutos: glicose (3,10), frutose (3,34), sacarose (5,06) e isomaltulose (6,32).

2.3.2 – Planejamento experimental e análise estatística

Para verificar a influência da concentração de substrato e da temperatura na transformação enzimática da sacarose em isomaltulose, pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, utilizou-se um planejamento baseado na Metodologia de Superfície de Resposta. As variáveis independentes estudadas foram as seguintes: concentração de sacarose (12,5 – 60% p/v) e temperatura (25 – 35°C). Foram realizados onze ensaios, quatro do fatorial completo, quatro do planejamento estrela e três repetições no ponto central.

Todos os cálculos estatísticos usados na análise dos resultados, foram realizados com o emprego de programas computacionais (STATISTICA versão 5.0), utilizando-se o “Experimental Design”. A qualidade do ajuste de modelos polinomiais foi expressa pelo coeficiente de determinação R², e sua significância estatística determinada pelo teste F. A superfície de resposta foi construída a partir da equação de regressão.

2.4 – Purificação do xarope de isomaltulose

O xarope obtido através da conversão enzimática da solução de sacarose 30% (p/v), a 35°C, utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, foi purificado através de cromatografia de troca aniônica em coluna Dowex MSA1 (30cm de comprimento e 4cm de diâmetro), previamente tratada com hidróxido de sódio 3% (p/v) e lavada com água deionizada até pH 11. O fluxo utilizado foi de 8mL de xarope por minuto. Em seguida o xarope foi purificado através de cromatografia de troca catiônica em coluna Dowex 88 (30cm de comprimento e 4cm de diâmetro), previamente ativada com ácido clorídrico 7% (v/v) e lavada com água deionizada até pH 3,0. Para finalizar o processo de purificação, o xarope foi eluído em uma coluna contendo a mistura das resinas descritas acima na proporção (1:1). A ausência de íons no xarope foi confirmada através de espectrômetro de chama.

2.5 – Cristalização da isomaltulose

Após a deionização, o xarope foi concentrado a cerca de 70% (p/v) a 52,7°C, num rotavapor RE 120 e, realizou-se um de perfil de cristalização, variando-se lentamente a temperatura de 40°C a 10°C. Para a execução do perfil, o xarope foi colocado em um banho-maria, inicialmente a 40°C, e submetido a agitação constante. O banho-maria foi programado para abaixar 5°C/hora entre 40°C e 35°C e 2°C/hora entre 35°C e 25°C e, finalmente, 3°C/hora entre 25°C e 10°C, finalizando-se assim a cristalização. Os cristais de isomaltulose fo-

ram coletados por centrifugação contínua a 3300rpm por 10 minutos, em centrífuga de bancada, adaptada com cesto de nylon. Os cristais foram borrifados com água gelada (5°C), durante a centrifugação. A secagem dos cristais de isomaltulose foi efetuada a 80°C em estufa a vácuo por 1 hora. O processo de cristalização foi realizado de acordo com a metodologia empregada por XYROFIN et al. [21], com modificações.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Efeito da concentração de sacarose ou de melão e de peptona do meio de cultura na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12

Verificou-se um aumento na atividade da enzima glicosiltransferase, em função do aumento da concentração de melão e sacarose no meio de cultura, em todos os tempos de fermentação analisados (*Tabela 1*). Acredita-se que as linhagens produtoras de glicosiltransferase promovam a isomerização ou transglicosilação da sacarose em isomaltulose, como um método de sequestrar irreversivelmente carbono e energia numa forma menos usada pela planta hospedeira e por outros microrganismos as quais poderiam competir pela sacarose. Esta hipótese baseia-se no fato de que *in vitro* a atividade de invertase de leveduras foi inibida pela isomaltulose, prevenindo assim a utilização da sacarose [1].

No meio de cultura contendo sacarose, o aumento da atividade da glicosiltransferase não foi tão efetivo quanto no meio contendo melão (*Tabela 1*), provavelmente pelo fato do melão ser um composto complexo contendo sais minerais, vitaminas e outros nutrientes que estimulariam o crescimento microbiano. Para verificar a influência de concentrações ainda maiores de melão, um novo experimento foi realizado, utilizando-se concentrações de melão 0-20% (p/v) de sólidos solúveis totais. Nas condições experimentais utilizadas, a linhagem *Erwinia* sp D12 apresentou maior atividade de glicosiltransferase (12,46 unidades de atividade/mL de meio de cultura), quando utilizou-se melão na concentração de 12% (p/v) de sólidos solúveis totais e após 15 horas de fermentação (*Tabela 2*). Acima desta concentração a atividade diminuiu sendo que, utilizando-se melão na concentração de 16% (p/v) de sólidos solúveis totais no meio de cultura, não foi observada produção de glicosiltransferase, provavelmente devido à inibição do crescimento microbiano em altas concentrações de açúcares. O efeito inibitório de concentrações elevadas de substrato está relacionado, em células vivas, a fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise. As possíveis razões para o fenômeno são a repressão na síntese de enzima e a desidratação dos sistemas enzimáticos, devido à perda de água da célula ou à inibição do transporte de nutrientes para o seu interior. A célula viva polui o seu ambiente com produtos do seu metabolismo até cessar o crescimento e, eventualmente, perder a sua viabilidade, fenômeno co-

nhecido como inibição pelo produto [6]. Os resultados obtidos (*Tabelas 1 e 2*) demonstram que o melão de cana é uma excelente fonte alternativa de carbono no meio de cultivo, pois além de diminuir os custos de produção de isomaltulose (valor comercial inferior ao da sacarose), também contribuiu para aumentar a atividade enzimática.

TABELA 1. Influência da concentração de sacarose (0-10% p/v) ou de melão (0-10% p/v de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de cultivo

Concentração de melão ou sacarose (% p/v)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)					
	6 horas		15 horas		24 horas	
	Melão	Sacarose	Melão	Sacarose	Melão	Sacarose
0	-	-	-	-	-	-
2	3,32	3,73	2,44	3,50	3,02	3,94
4	4,66	5,08	4,45	3,88	4,76	4,82
6	6,30	4,90	6,69	5,60	5,80	5,13
8	7,93	5,74	7,77	6,10	7,50	5,52
10	9,08	6,69	8,67	5,90	8,50	6,80

TABELA 2. Influência da concentração de melão (0-20% p/v de sólidos solúveis totais) no meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de fermentação

Concentração de melão (% p/v)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)		
	6 horas	15 horas	24 horas
0	-	-	-
2	3,69	3,85	3,05
4	5,93	6,43	4,16
6	6,44	6,44	5,18
8	8,42	8,80	7,50
10	10,4	10,9	8,93
12	10,3	12,4	10,9
14	-	9,07	9,50
16	-	-	-
20	-	-	-

Em relação à fonte de nitrogênio do meio de cultura, verificou-se que o aumento da concentração de peptona estimula a produção de glicosiltransferase até atingir um ótimo de produção (12,80 unidades de atividade/mL de meio de cultura), provocando, posteriormente, uma diminuição da atividade em concentrações acima da ideal (*Tabela 3*). O estímulo a produção de glicosiltransferase, deve-se ao fato de que a peptona é fonte de nitrogênio favorecendo o crescimento celular por fornecer elementos essenciais a biossíntese de proteínas, enzimas e bases nitrogenadas.

A fonte de nitrogênio do meio de cultivo pode ser orgânica ou inorgânica, mas de acordo com HUANG,

HSU & SU [9], as células de *Klebsiella planticola* apresentam maior atividade de glicosiltransferase em meios contendo fonte de nitrogênio orgânica.

TABELA 3. Influência da concentração de peptona no meio de cultivo, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12 em diferentes tempos de fermentação

Concentração de peptona (% p/v)	Massa celular* (g/L)	Atividade de glicosiltransferase (unidade de atividade/mL de meio de cultura)	
		15 horas de fermentação	
		15 horas de fermentação	15 horas de fermentação
0	-	-	-
2	4,52	10,4	10,4
4	6,22	12,8	12,8
6	4,21	9,09	9,09
8	4,61	5,64	5,64
10	4,81	5,34	5,34

* Massa celular seca

3.2 – Estudo da influência do tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12, a 28°C, 30°C e a 32°C

A atividade enzimática da glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 é influenciada pela temperatura e pelo tempo de fermentação. A maior atividade apresentada (15,61 unidades de atividade/mL de meio de cultura) foi a 30°C em 8 horas de fermentação, coincidindo com a fase exponencial do seu crescimento, caracterizando a enzima como um metabólito primário. Após 48 horas de fermentação a 30°C a atividade diminuiu para 9,40 unidades de atividade/mL de meio de cultura (Tabela 4).

TABELA 4. Influência da temperatura e do tempo de fermentação na atividade da glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12, durante a fermentação em um meio contendo melaço 12% (p/v) de sólidos solúveis totais, extrato de carne 0,4 % (p/v) e de peptona 4% (p/v)

Tempo de fermentação	28°C			30°C			32°C		
	Atividade U/mL	Massa celular (g/L)	pH	Atividade U/mL	Massa celular* (g/L)	pH	Atividade U/mL	Massa celular* (g/L)	pH
0	0,64	0,50	5,78	1,80	0,50	5,58	0,86	0,40	5,86
2	0,68	0,86	6,03	2,20	1,05	5,75	1,14	0,83	5,85
4	2,73	1,95	5,86	5,07	2,56	5,60	3,26	1,55	5,61
6	13,1	3,48	5,60	14,5	4,33	5,56	3,30	1,55	5,33
8	13,6	3,79	5,56	15,6	4,47	5,69	5,62	3,00	5,63
10	13,9	3,80	5,57	13,9	4,62	5,55	5,76	2,89	5,46
12	11,2	3,74	5,48	12,7	4,97	5,42	4,88	3,35	5,36
14	13,0	3,56	5,42	11,6	4,85	5,35	4,82	3,15	5,32
16	13,2	3,92	5,39	11,2	4,87	5,31	5,03	3,36	5,28
24	11,3	4,08	5,32	11,2	3,28	5,24	4,88	3,22	5,25
36	9,14	4,11	5,31	10,9	3,75	5,20	5,51	3,90	5,61
48	10,5	4,18	5,32	9,40	3,60	5,12	5,62	4,01	5,57

* Massa celular seca

Estes resultados foram compatíveis com EGERER [7], que também observou um aumento na atividade da

enzima sacarose mutase, também conhecida como glicosiltransferase, de *Protaminobacter rubrum*, em 8 horas de fermentação, na fase logarítmica de crescimento celular. O autor sugeriu que este fato pode ser explicado pela formação periplásmica da sacarose mutase durante o crescimento celular e pela mudança estrutural das proteínas nas fases finais de crescimento e nas células velhas.

Em temperaturas acima (32°C) ou abaixo (28°C) da ideal, verificou-se uma diminuição da atividade sendo esta mais pronunciada a 32°C, devido ao fato da enzima ser termossensível [2]. O pH do meio de fermentação manteve-se entre 5 e 6 durante todo o período da fermentação nas três temperaturas testadas, sugerindo pouca produção de ácido como sub-produto.

3.3 – Efeito da concentração de substrato e da temperatura no rendimento de isomaltulose utilizando-se célula imobilizada de *Erwinia* sp D12

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados do rendimento de isomaltulose (variável dependente), obtidos nos ensaios.

TABELA 5. Resultados dos ensaios de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, realizados de acordo com o Planejamento Experimental

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de sacarose (% p/v)	Rendimento de isomaltulose (%)
1	26,5	19,4	40,3
2	33,5	19,4	56,4
3	26,5	53,1	29,1
4	33,5	53,1	30,1
5	25,0	36,2	47,2
6	35,0	36,2	51,5
7	30,0	12,5	46,8
8	30,0	60,0	31,3
9 (C)	30,0	36,2	39,9
10 (C)	30,0	36,2	39,9
11 (C)	30,0	36,2	40,4

C: ensaio no ponto central.

Analisando-se os efeitos das duas variáveis independentes, temperatura e concentrações de sacarose, foram obtidos os valores de 6,65 para a estimativa do efeito da temperatura e – 3,62 para o estudo do efeito da concentração de sacarose. Estes resultados indicam que quando a temperatura variou de 25 a 35°C ocorreu um aumento médio no rendimento de isomaltulose de 6,65 e quando a concentração de sacarose variou de 12,5 para 60% (p/v) observou-se uma redução média de 3,62 no rendimento de isomaltulose. De acordo com a Tabela 5, obteve-se um rendimento de 56,4% de isomaltulose utilizando-se 19,4% (p/v) de sacarose a 33,5°C, enquanto que com uma concentração de sacarose de 60,0% (p/v) a 30°C, obteve-se um rendimento de 31,3% de isomaltulose. Verificou-se que o rendimento

to de isomaltulose tende a aumentar com a diminuição da concentração de sacarose e com o aumento da temperatura, na faixa experimental estudada. O efeito de interação entre temperatura e concentração de sacarose foi significativo e negativo, ou seja, a interação não favorece a produção de isomaltulose (Tabela 6).

TABELA 6. Estimativa dos efeitos da temperatura e da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t (2)	P	- 95% Limite de confiança	95% Limite de confiança
Mean/Intrec	40,0844	0,1733	231,2561	0,000019	39,3386	40,8302
Temperatura (L)	5,7597	0,2123	27,1294	0,001356	4,8462	6,6732
Temperatura (Q)	6,6495	0,2527	26,3111	0,001441	5,5621	7,7369
Concentração de sacarose (L)	-14,8344	0,2123	-69,8731	0,000205	-15,7479	-13,9209
Concentração de sacarose (Q)	-3,6236	0,2527	-14,3381	0,004829	-4,7110	-2,5362
Temperatura X sacarose	-7,5600	0,3032	-25,1814	0,001573	-8,8518	-6,2682

(L)= linear; (Q)= quadrático.

A análise de variância dos resultados dos ensaios está apresentada na Tabela 7.

TABELA 7. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em função da concentração de substrato e da temperatura

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	F5%
Regressão	675,7068	5	135,1414	6,84	5,05
Resíduo	98,7455	5	19,7491		
Falta de ajuste	98,5652	3	32,8551	364,45	19,16
Erro puro	0,1803	2	0,09015		
TOTAL	774,4523	10	77,4452		

SQ = soma quadrática; GL = número de graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F calculado; F_{5%} = valores críticos de F ao nível de 5%.

Analisando-se a Tabela 7 pode-se verificar que a regressão foi significativa ($p \leq 0,05$), pois o valor de F calculado foi maior que o tabelado, mas não foi preditiva pois o valor obtido não foi superior a seis vezes o valor de F calculado. O modelo apresentou também falta de ajuste significativa ($p \leq 0,05$). Porém, o erro experimental não foi significativo.

O modelo obtido foi o seguinte: $Y = 196,679686 - 13,071999X + 1,942440Z + 0,270200X^2 - 0,064095XZ - 0,006354Z^2$, onde X= temperatura; Z= sacarose e Y= rendimento de isomaltulose.

O modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8725 a $p \leq 0,05$, ou seja, pelo menos 87,25% da variação do rendimento de isomaltulose foi explicado pelo modelo.

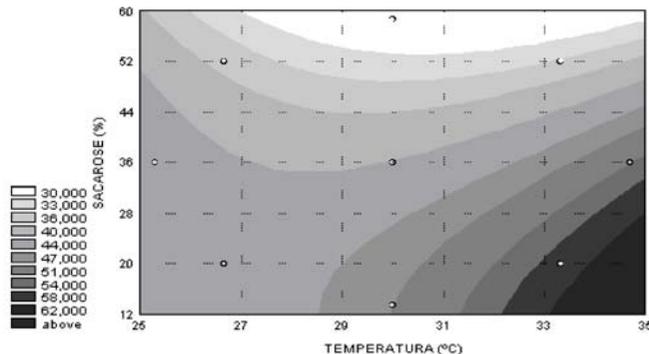


FIGURA 1 – Curva de contorno referente ao rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose.

Através da curva de nível obtida para o rendimento de isomaltulose (Figura 1) constatou-se que na faixa de 20 a 30% (p/v) de sacarose, o rendimento de isomaltulose situa-se em torno de 50% de conversão, influenciado pelo aumento da temperatura. Verificou-se também que concentrações em excesso de sacarose (ao redor de 40% p/v) afetam a atividade da célula imobilizada devido ao efeito inibitório. Em função dos resultados, testou-se um novo experimento em fatorial completo, utilizando-se concentrações de 20 a 30% (p/v) de sacarose e temperaturas de 35 a 40°C, cujos resultados demonstraram, que o aumento da temperatura não teve efeito significativo no rendimento de isomaltulose, mas houve um efeito significativo ($p < 0,05$) da concentração da sacarose (Tabela 8), ou seja, quanto maior a quantidade de sacarose, maior o rendimento de isomaltulose na faixa experimental estudada sendo que este aumento não foi na mesma proporção para cada acréscimo na quantidade de sacarose, ocorrendo uma maior variação em concentrações maiores de sacarose (Figura 2).

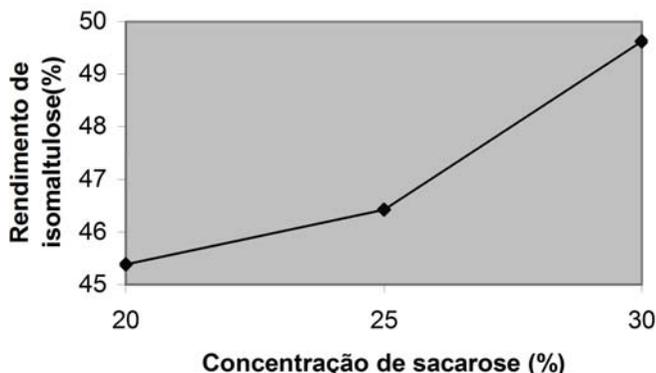


FIGURA 2. Rendimento de isomaltulose em função da concentração de sacarose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12

Esta influência da concentração de sacarose na atividade de glicosiltransferase também foi verificada no experimento desenvolvido por TATE & LYLE [19], com células imobilizadas de *Erwinia raphontici* e concentra-

ções de sacarose de 12,5 a 60% (p/v) a 30°C. Os autores obtiveram maior produção de isomaltulose (1,18g produto/massa de células/hora) utilizando 35% (p/v) de sacarose com uma vida média de 415 horas, sendo que usando 55% (p/v) de sacarose a conversão diminuiu chegando a 0,82g produto/massa de células/hora, mas a vida média aumentou para 4000 horas.

TABELA 8. Análise de variância do rendimento de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12 em função da concentração de substrato (20-30% p/v) e da temperatura (35-40°C), para o experimento fatorial completo

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Sacarose	2	19,62491	9,812455	6,102763	0,035797
Temperatura	1	1,84868	1,84868	0,574883	0,477040
Sac X Temp	2	4,28657	2,143285	1,332997	0,331893
Erro	6	3,215742	0,535957		

SQ = soma quadrática; GL = número de graus de liberdade; QM = quadrado médio; F = F calculado; F_{5%} = valores críticos de F ao nível de 5%.

De acordo com CHEETHAM [5], o excesso de concentração de sacarose possui poder inibitório sobre a célula imobilizada, mas pode aumentar a estabilidade da mesma. Portanto, o aumento na estabilidade da célula imobilizada com o aumento da concentração da sacarose compensa a diminuição da atividade, uma vez que a produtividade da coluna contendo microrganismos imobilizados aumenta. Alta concentração de sacarose promove um equilíbrio entre isomaltulose e sacarose favorecendo a formação de isomaltulose, pois a enzima é sacarose específica ocorrendo uma estabilização pelo produto ou pelo produto e substrato, reduz a formação de gases e ácidos como subprodutos, reduz a atividade de proteases endógenas e tende a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana devido a fenômenos osmóticos e facilita a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado.

Os resultados obtidos foram compatíveis com XYROFIN et al. [21], que também verificaram que a transformação enzimática da sacarose em isomaltulose através de células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e de *Erwinia rhapontici* em DEAE-celulose modificada é influenciada pela temperatura, concentração de sacarose e fluxo do substrato através da coluna. Os autores constataram que a reação é preferivelmente efetuada em uma coluna empacotada a 30°C com solução de sacarose 25% (p/v) em fluxos lentos (0,02-0,12 volume do leito por hora). Temperaturas de 35 a 45°C comprovaram ser parcialmente inativantes, e temperaturas acima de 55°C inativaram totalmente a células de *Protaminobacter rubrum* em 24 horas. A concentração de sacarose deve ser mantida preferivelmente entre 25 e 35% (p/v). Observou-se que concentrações de sacarose acima de 55% (p/v) reduzem de modo significativo a conversão em um curto período de tempo. Os melhores resultados com células de *Protaminobacter rubrum*: isomaltulose 79%, trealulose 0,9%, frutose 0,4%, glicose 0,6% e sacarose 18,5%, fo-

ram obtidos quando utilizou-se solução de sacarose 25% (p/v) a 30°C e com um fluxo de 0,08 volume do leito por hora. Células de *Serratia plymuthica* produziram: isomaltulose 80%, trealulose 7,5%, frutose 5,5%, glicose 3% e as de *Erwinia rhapontici* produziram: isomaltulose 79%, trealulose 15%, frutose 0,5% e glicose 0,5%, quando utilizaram soluções de sacarose a 25% (p/v) a 30°C com fluxos de 0,12 e 0,02 volume do leito por hora, respectivamente.

Através da análise cromatográfica realizada de acordo com o item "Determinação da conversão de sacarose em isomaltulose", detectou-se também glicose, frutose, sacarose e outros açúcares, que podem ser trealulose, isomaltulose e isomelzitose, durante a conversão enzimática da sacarose em isomaltulose. De acordo com CHEETHAM [3], a enzima que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose é sacarose específica, mas catalisa uma reação não seletiva, produzindo simultaneamente isomaltulose e trealulose. FUJI et al. [8], detectaram trealulose, isomaltulose e isomelzitose como subprodutos da síntese de isomaltulose a partir da sacarose por *Serratia plymuthica*, e XYROFIN et al. [21] detectou isomaltulose e trealulose utilizando células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapontici*.

3.4 – Purificação e cristalização da isomaltulose

A presença dos íons cloreto, sódio e cálcio no xarope obtido após conversão enzimática da sacarose utilizando-se células imobilizadas de *Erwinia* sp D12, foi devido ao processo de imobilização celular, no qual é utilizado alginato de sódio e cloreto de cálcio. Devido à seletividade da resina catiônica para alcalinos e alcalinos terrosos, a mesma foi eficiente na eliminação dos íons sódio e cálcio, enquanto que a aniônica eliminou o cloreto. Após a purificação, o xarope apresentou pH 8,0, resistividade de 300.000ohm/cm demonstrando uma baixa condutividade e ausência de cloreto, sódio e cálcio. CHEETHAM et al. [4] utilizou resina aniônica (Amberlite IRA 93) e uma catiônica (Amberlite 200) e MEITO SANGYO et al. [14] utilizou resina IR 120b e IRA-411 (Organo Co.) para a deionização do xarope. De acordo com XYROFIN et al. [21] a isomaltulose pode ser purificada por troca iônica, através da remoção de impurezas e produtos secundários.

Após a deionização do xarope, concentração e cristalização, os cristais recuperados foram analisados por HPLC e apresentaram 91,39% de isomaltulose. Esta porcentagem de isomaltulose foi obtida através de apenas um processo de cristalização, podendo obter um produto mais puro se o mesmo for recristalizado. CHEETHAM [4], obtiveram cristais contendo 99% de isomaltulose após dois processos de cristalização. A obtenção de cristais de isomaltulose do xarope é facilitada pela menor solubilidade deste açúcar (37g/100mL de água a 20°C) comparada com a sacarose [11]. Durante o processo de cristalização, deve-se efetuar lentamente o abaixamento da temperatura para não ocorrer a formação de cristais gomosos e finos, que podem ser

perdidos na lavagem durante a centrifugação, diminuindo o rendimento.

4 – CONCLUSÕES

O melaço é uma excelente fonte alternativa de carbono e energia para o meio de cultivo da *Erwinia* sp D12, pois estimula a atividade de glicosiltransferase e reduz o custo do processo.

A produção máxima de glicosiltransferase pela linhagem de *Erwinia* sp D12 é obtida na fase exponencial de crescimento após 8 horas de cultivo a 30°C, em meio de cultivo contendo melaço 12% (p/v) de sólidos solúveis totais, peptona 4% (p/v) e de extrato de carne 0,4% (p/v). Temperaturas acima ou abaixo da ideal diminuem a atividade.

O rendimento de isomaltulose utilizando-se concentrações de sacarose em torno de 20-30% (p/v) a 35°C é de 45 a 50% sendo que nesta faixa experimental, quanto maior a concentração de substrato, maior o rendimento de isomaltulose.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BORNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.8, p.2425-2430, 2001.
- [2] CELESTINO, E. M. **Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1998. 75 p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [3] CHEETHAM, P. S. J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. **Biochemistry Journal**, v. 220, p. 213-220, 1984.
- [4] CHEETHAM, P. S. J. Production of isomaltulose using immobilized microbial cells. **Methods in Enzymology**, v 136, p. 432-454, 1987.
- [5] CHEETHAM, P. S.J.; GARRETT,C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471 – 481, 1985.
- [6] DERVAKOS, G.; WEBB, C. On the merits of viable-cell immobilization. **Biotechnology Advances**, v.9, p.559-612, 1991.
- [7] EGERER, P. Downstream processing of sucrose 6-glucosylmutase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v.36, n.3-4, p.65-77, 1994.
- [8] FUJI, S.; KISHIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 30, n. 6, p. 339-344, 1983.
- [9] HUANG, J.H.; HSU, L.H. & SU, Y.C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.22-27, 1998.
- [10] KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose-based oligomers feeding and calcium deficiency on mineral retention in rats. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v.42, p.69-76, 1996.
- [11] KOGA, T.; MIZUTANI, T. Applications of palatinose for foods. **Proc. Res. Soc. Jap. Sugar Refineries Tech.**, v. 34, p. 45-57, 1985.
- [12] KRASTANOV, A.; YOSHIDA, T. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, p. 593-598, 2003.
- [13] LICHTENTHALER, F.W. Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. **Carbohydrate Research**, v.313, p.69-89, 1998.
- [14] MEITO SANGYO, K. K.; SUSUMU, H.; NOBUO, K.; SHINJIRO, I. **Process for producing isomaltulose**. EP. n. 0392556 A1, 13 abr. 1989, 17 out. 1990.
- [15] NAGAI-MIYATA, Y.; TSUYUKI, K.; SUGITANI,T.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of a trealulose-producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 2049-2053, 1993.
- [16] ROQUETTE FRERES, P. D.; FOUACHE, C. **Method for producing palatinol**. US. n. 6.204.378, 29 mai. 1997, 20 mar. 2001.
- [17] SHARPE, E. S.; STODOLA, F.H.; KOEPESELL, H. J. Formation of isomaltulose in Enzymatic Dextran synthesis. **The Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.1062-1063,1960.
- [18] SOMOGYI-NELSON, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- [19] TATE & LYLE, Christopher Bucke; Peter Samuel James Cheetham. **Production of isomaltulose**. UK n. 2063268A, 7 nov. 1979, 3 jun. 1981.
- [20] UEKANE, R.T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 63 p.
- [21] XYROFIN. O.Y.; MARJA-LEENA, S.; HEIKKI, H.; TAPIO, V. **Processos para a isomerização de sacarose em isomaltulose para a produção de isomalte a partir de sacarose, e, veículo adaptado para uso em um processo microbiano para a isomerização de sacarose em isomaltulose**. BR. n. PI 9709100-6A, 16 mai. 1987, 11 jan. 2000.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado.