

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos**

**PRODUÇÃO DE GLICOSILTRANSFERASE DE *Klebsiella*
sp 18 E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CONVERSÃO
DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE**

Daniela Castilho Orsi
Farmacêutica-Bioquímica

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

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

**Campinas, São Paulo
2004**

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida em de de 2004, sendo a banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Profa. Dra. Ana Lúcia Leite Moraes
Membro

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Membro

Prof. Dr. Yong Kun Park
Membro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antônio Marcos Orsi e Maria de Fátima Castilho Orsi pelo permanente incentivo a apoio

Ao meu namorado Vinicius Texeira de Macêdo pelo companheirismo e paciência

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa Hélia Harumi Sato pela confiança e paciência durante a elaboração do trabalho

À Profa Helena Teixeira de Godoy pelo apoio e orientação iniciais no programa de Mestrado em Ciência de Alimentos

Ao colega Haroldo Kawaguti pelo grande auxílio na parte prática e teórica deste trabalho

Aos assessores: de imagens Alessandra, de editoração Antônio Marcos e de elaboração de gráficos André e Vinicius

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos

À CAPES pelo apoio institucional

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Microrganismos produtores de isomaltulose.....	3
2.2 Características e aplicações da isomaltulose	5
2.3. Conversão de sacarose em isomaltulose	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Manutenção do microrganismo	15
3.2. Otimização do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Klebsiella</i> sp 18.....	15
3.2.1. Preparação do pré-inóculo	16
3.2.2. Fermentação	16
3.2.3. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada.....	16
3.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultura e produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Klebsiella</i> sp 18.....	17
3.3.1. Preparação do inóculo	17

3.3.2. Fermentação	18
3.3.3. Determinação do pH do meio de cultura, do crescimento do microrganismo e da atividade de glicosiltransferase.....	18
3.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de <i>Klebsiella</i> sp 18 immobilizadas com alginato de cálcio	19
3.4.1. Produção de massa celular de <i>Klebsiella</i> sp 18.....	19
3.4.2 Estudo do efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização de células de <i>Klebsiella</i> sp 18 e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator	20
3.4.3. Análise dos carboidratos por cromatografia de troca iônica	22
3.4.4. Estudo do efeito da concentração de células de <i>Klebsiella</i> sp 18 na imobilização com alginato de cálcio e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator:.....	24
3.4.5. Estudo do efeito da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células de <i>Klebsiella</i> sp 18 immobilizadas com alginato de cálcio em bioreator	26
3.4.6. Estudo da estabilidade da enzima glicosiltransferase das células de <i>Klebsiella</i> sp 18 immobilizadas com alginato de cálcio	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Otimização do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem <i>Klebsiella</i> sp 18.....	29
4.1.1. Primeiro planejamento fatorial completo	29
4.1.2. Segundo planejamento fatorial completo.....	36

4.2 Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela linhagem de <i>Klebsiella</i> sp 18 em fermentador de 5 litros a 26°C, 28°C, 30°C e 35°C.	46
4.3. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de <i>Klebsiella</i> sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio	53
4.3.1. Estudo do efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização de células de <i>Klebsiella</i> sp 18 e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator	53
4.3.2. Estudo do efeito da concentração de células de <i>Klebsiella</i> sp 18 na imobilização com alginato de sódio e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator	55
4.3.3. Efeito da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator utilizando células de <i>Klebsiella</i> sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio	57
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Primeiro planejamento experimental completo codificado para estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18.30

TABELA 2: Valores decodificados utilizados no primeiro planejamento fatorial completo no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18. 30

TABELA 3: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao primeiro planejamento. 31

TABELA 4: Análise de variância no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao primeiro planejamento. 32

TABELA 5: Segundo planejamento experimental completo codificado para estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18.....37

TABELA 6: Valores decodificados utilizados no segundo planejamento fatorial completo no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18. 37

TABELA 7: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao segundo planejamento. 38

TABELA 8: Análise de variância no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao segundo planejamento.....39

TABELA 9: Custo do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase45

TABELA 10: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melaço de cana (80,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 26°C. 47

TABELA 11: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de

melaço de cana (80,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 28°C..... 48

TABELA 12: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 30°C..... 49

TABELA 13: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 35°C..... 50

TABELA 14: Produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, em meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 litros, a 26°C, 28°C, 30°C e 35°C, após 8 e 24 horas de fermentação..... 51

TABELA 15: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio..... 54

TABELA 16: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 35% e suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio..... 56

TABELA 17: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45% e suspensão celular 20% (p/v) de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio 58

TABELA 18: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio, após 8, 24, 48, 72, 96 e 130 horas..... 60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Conversão de sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase.....	1
FIGURA 2: Ilustração da fermentação do microrganismo <i>Klebsiella</i> sp 18 em fermentador de 5 litros, utilizando-se meio de cultura otimizado composto de 80 g/L de melaço de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®, a 28°C, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm.....	20
FIGURA 3: Ilustração do processo de imobilização da suspensão de células de <i>Klebsiella</i> sp 18 com alginato de sódio Synth® em solução de cloreto de cálcio 2% (p/v), com auxílio de bomba peristáltica multicanal.....	21
FIGURA 4: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20% de massa celular de <i>Klebsiella</i> sp 18 imobilizadas com soluções 2%, 3% e 4% de alginato Synth®, utilizando-se solução de sacarose 35%.	23
FIGURA 5: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de <i>Klebsiella</i> sp 18 imobilizadas com alginato Synth® 2%, utilizando-se solução de sacarose 35%.	25
FIGURA 6: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20% de massa celular de <i>Klebsiella</i> sp 18 imobilizadas com alginato Synth® 2%, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45%.	27

FIGURA 7: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás[®], referente ao primeiro planejamento..... 33

**FIGURA 8: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao primeiro planejamento. ...
..... 34**

FIGURA 9: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao primeiro planejamento..... 35

**FIGURA 10: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás[®], referente ao segundo planejamento.
..... 40**

**FIGURA 11: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao segundo planejamento. ..
..... 41**

FIGURA 12: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao segundo planejamento.....42

FIGURA 13: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 26°C..... 47

FIGURA 14: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 28°C..... 48

FIGURA 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 30°C 49

FIGURA 16: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 35°C..... 50

FIGURA 17: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio..... 54

FIGURA 18: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 35% e suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio. 56

FIGURA 19: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45% (p/v) e suspensão celular 20% (p/v) de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio. 58

FIGURA 20: Cromatograma dos padrões de glicose, frutose, sacarose e isomaltulose..... 61

FIGURA 21: Cromatograma dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pelas células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio..... 62

RESUMO

A linhagem *Klebsiella* sp 18 produz a enzima glicosiltransferase que converte sacarose (O- α -D-glicopiranosil-1,2-frutofuranosídeo) em isomaltulose (O- α -D-glicopiranosil-1,6- β -frutofuranose). A isomaltulose é um açúcar encontrado naturalmente em pequenas quantidades no mel e no caldo de cana-de-açúcar e que devido ao baixo potencial cariogênico, tem sido utilizado como açúcar alternativo em alimentos.

Neste trabalho foi testado o efeito do melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18. A otimização do meio de cultivo foi realizada através da metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta, utilizando-se planejamentos fatoriais completos. A concentração ótima dos componentes do meio de cultivo para maior produção de glicosiltransferase foi de 80 g/L de melaço de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. Neste meio de cultivo otimizado para a linhagem *Klebsiella* sp 18, foi obtido atividade enzimática de 9,94 UA/mL, com fermentação realizada em frascos sob agitação a 200 rpm, 30°C e 24 horas.

Foi estudada a relação entre o tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultivo, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase em diferentes temperaturas variando de 26°C a 35°C, através do cultivo da linhagem *Klebsiella* sp 18, em fermentador de 5 L, utilizando-se o meio de cultivo otimizado. A maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 8 horas de fermentação na temperatura de 28°C, sendo obtido atividade enzimática de 21,78 UA/mL.

Estudou-se a imobilização de células de *Klebsiella* sp 18 com alginato de cálcio e a conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator. Foram analisados os efeitos da concentração de alginato Synth[®] (2% a 4%), da concentração de massa celular (20% a 40%) e da concentração de substrato (25% a 45%) no processo de conversão de sacarose em isomaltulose e o tempo de vida útil das células imobilizadas. Obteve-se rendimento de isomaltulose de 62,1%, após 24 horas e 52,6% após 72 horas de reação a 30°C, utilizando-se 20% de suspensão de células (massa celular úmida/ volume) de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de cálcio Synth[®] e solução de sacarose 35% (p/v)

SUMMARY

The strain *Klebsiella* sp 18 produces glucosyltransferase, an enzyme that converts sucrose in isomaltulose. This sugar is not cariogenic and it is naturally found in small amounts in honey and sugar cane. Isomaltulose has been used as an alternative sugar in food production.

The optimization of culture medium for the production of glucosyltransferase by *Klebsiella* sp 18, in shake flasks, was realized using experimental design methodology and surface response analysis. The medium components studied were sugar cane molasses, bacteriological peptone and yeast extract Prodex Lac SD[®]. The highest glucosyltransferase production was reached in culture medium composed of 80 g/L of sugar cane molasses, 7 g/L of bacteriological peptone and 20 g/L of yeast extract Prodex Lac SD[®]. The cultivation of *Klebsiella* sp 18 using the optimized medium showed an enzyme activity of 9,94 AU/mL, after 24 hours, at 30°C.

The relationship between fermentation time, change of medium pH, growth of microorganism and glucosyltransferase production was studied using 5 liters fermentation vessel, with optimized culture medium, at different temperatures from 26°C to 35°C. The highest enzyme activity, 21,78 AU/mL, was reached after 8 hours, at 28°C.

The immobilization of *Klebsiella* sp 18 cells in calcium alginate and the conversion from sucrose to isomaltulose was studied. The effects of cell and calcium alginate concentrations on cell immobilization were also verified. The best conversion rate of sucrose to isomaltulose was 62,1% after 24 hours, using 20% of cellular suspension and 2% of calcium alginate solution.

1. INTRODUÇÃO

A produção de açúcares alternativos a partir da sacarose tem grande importância na indústria de alimentos e farmacêutica. A isomaltulose (O- α -D-glicopiranosil-1,6-frutofuranosídeo) é um açúcar alternativo que pode ser obtido a partir da sacarose por transformação enzimática da ligação glicosil de (1 \rightarrow 2) frutósídeo para (1 \rightarrow 6) frutósídeo.

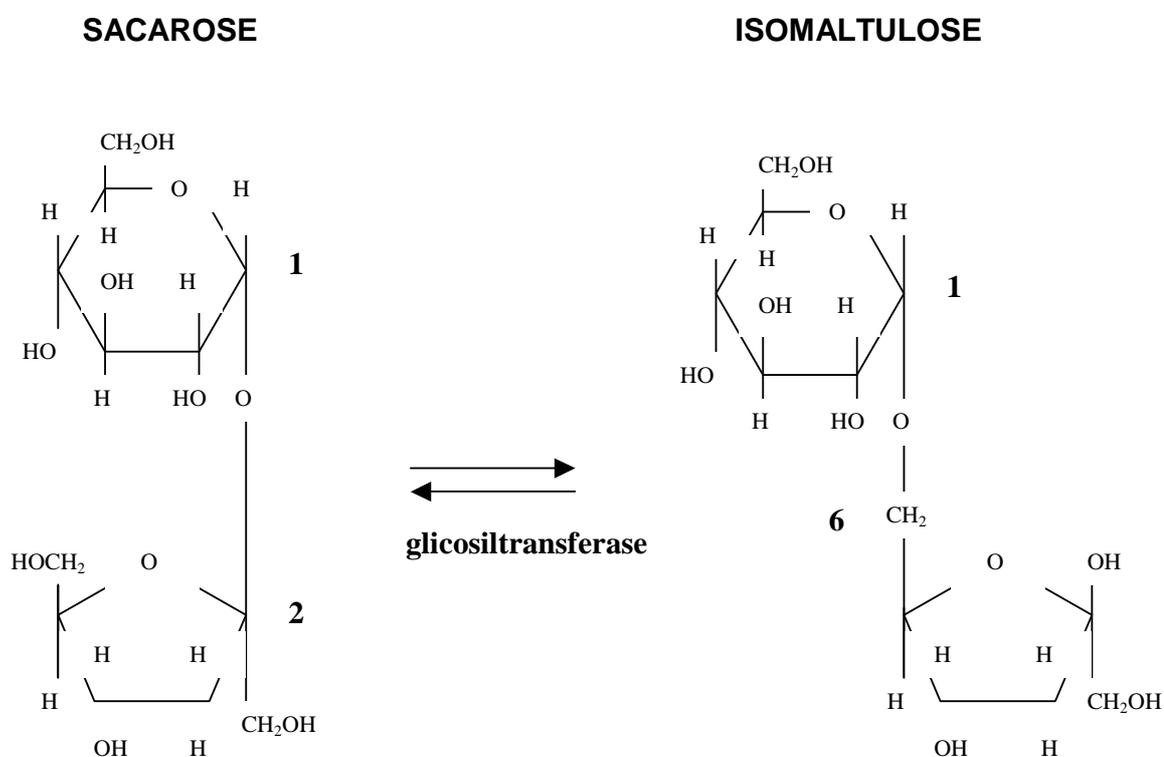


FIGURA 1: Conversão de sacarose em isomaltulose pela enzima glicosiltransferase.

A isomaltulose, também conhecida como palatinose, é um dissacarídeo redutor que tem propriedades físicas e organolépticas semelhantes as da sacarose, porém apresenta baixo potencial cariogênico, comparado com a sacarose. Essa propriedade tem despertado o interesse para seu uso comercial

em alimentos, sendo utilizada no Japão na produção de chocolates, gomas de mascar e biscoitos.

A isomaltulose também é utilizada na produção do açúcar-álcool isomalte (uma mistura equimolar de α -D-glicopiranosil-1,6-manitol e α -D-glicopiranosil-1,6-sorbitol) que apresenta baixo valor calórico, baixa cariogenicidade e baixa higroscopicidade em relação a outros açúcares álcoois tais como sorbitol, manitol e xilitol. O isomalte é comercializado como Palatinit[®] ou Isomalt[®] e apresenta sabor agradável semelhante ao do algodão doce.

Uekane, em 1995 isolou a linhagem *Klebsiella* sp 18, produtora de glicosiltransferase intracelular, que catalisa a conversão de sacarose em isomaltulose e estudou a purificação e caracterização bioquímica desta enzima.

O presente trabalho visou dar continuidade aos estudos da produção e aplicação da glicosiltransferase microbiana de *Klebsiella* sp 18. Foram otimizadas as condições de cultivo de *Klebsiella* sp 18, através da introdução de fontes alternativas de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, com o objetivo de aumentar a atividade enzimática e diminuir os custos de produção de isomaltulose a partir da sacarose.

Neste trabalho também foram estudadas as condições ótimas para a imobilização da massa celular de *Klebsiella* sp 18, com alginato de cálcio e a conversão da sacarose em isomaltulose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos produtores de isomaltulose

Os principais microrganismos descritos na literatura como produtores de glicosiltransferase capazes de converter sacarose para isomaltulose são *Protaminobacter rubrum* (Tsuyuki et al., 1992; Kakinuma et al., 1998; Sarkki et al., 1999), *Erwinia carotovora* (Lund et al., 1973), *Erwinia rhapontici* (Cheetham et al., 1982 e 1985), *Erwinia* sp (Moraes, 2002; Kawaguti, 2003), *Serratia plymuthica* (McAllister et al., 1990; Véronèse e Perlot, 1999), *Klebsiella planticola* (Huang et al., 1998) e *Klebsiella* sp (Park et al., 1992; Park et al., 1996).

A maioria dos microrganismos produtores de glicosiltransferase, além de converter sacarose para isomaltulose, também produzem trealulose (O- α -D-glicopiranosil-1,1-D-frutose) em menor quantidade e traços de glicose e frutose. As linhagens *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 (Sarkki et al., 1999), *Erwinia rhapontici* NCPPB 1579 (Cheetham, 1984), *Serratia plymuthica* NCIB 8285 (Fujii et al., 1983), *Klebsiella planticola* CCRC 19112 (Huang et al., 1998), produzem principalmente isomaltulose (75-85%), trealulose (14-16%) e pequena quantidade de glicose (2-6%) e frutose (2-3%). A linhagem *Serratia plymuthica* NCIB 8285 também produz pequena quantidade de isomelezitose (8%). Já as bactérias *Pseudomonas mesoacidophila* MX 45 (Miyata et al., 1992) e *Agrobacterium radiobacter* MX 232 (Nagai-Miyata et al., 1994), produzem mais trealulose (90%) do que isomaltulose.

O seqüenciamento genético da glicosiltransferase de *Klebsiella* sp LX3 (Zhang et al., 2002, 2003b) auxiliou no entendimento do mecanismo molecular da isomerização da sacarose em isomaltulose. A seqüência de bases do gene que codifica a enzima e sua estrutura secundária sugeriram que esta pertence à

família α -amilase e que provavelmente adota o mesmo mecanismo molecular de reação em duas fases, com hidrólise e formação de ligação glicosídica. O mecanismo da reação ocorre por catálise ácida, onde a ligação glicosídica é protonada por um doador de prótons e o carbono anomérico sofre um ataque nucleofílico, levando a formação do complexo intermediário enzima-substrato. Nessa fase da reação, o grupo glicosil pode ser transferido para uma molécula de água no caso de hidrólise e para o grupo frutose no caso da síntese dos isômeros da sacarose. Na fase seguinte de isomerização, a estrutura da frutose determina o balanço entre os dois isômeros da sacarose: isomaltulose e trealulose.

De acordo com Cheetham et al. (1982), a significativa adaptação de vários microrganismos para a produção de isomaltulose não é clara, podendo ser um método irreversível de seqüestrar energia e carbono em uma forma menos viável, para a planta hospedeira e para outros microrganismos que poderiam concorrer pela sacarose. A isomaltulose também é um potente inibidor da enzima invertase de leveduras, o que constitui uma outra estratégia para excluir competidores no uso da sacarose (Börnke, 2001).

Pikis et al. (2002), estudaram a clonagem e caracterização dos genes *malH* e *malB* de *Fusobacterium mortiferum* para explicar o metabolismo dos isômeros da sacarose: trealulose $\alpha(1\rightarrow1)$, turanose $\alpha(1\rightarrow3)$, maltulose $\alpha(1\rightarrow4)$, leucrose $\alpha(1\rightarrow5)$ e isomaltulose $\alpha(1\rightarrow6)$ usados por essa bactéria como fonte de energia para crescimento. O autor sugeriu que os genes *malH* e *malB* codificam uma enzima fosfo- α -glicosidase que catalisa a translocação fosforilativa e hidrólise intracelular dos isômeros da sacarose em glicose-6 fosfato e frutose, que dessa forma podem entrar para os ciclos de formação de energia da bactéria.

2.2 Características e aplicações da isomaltulose

A isomaltulose está naturalmente presente no mel em pequenas quantidades (1%), (Siddiqui & Furgala, 1967; Moreira et al., 2001). A isomaltulose apresenta aproximadamente 50% da doçura da sacarose (Hashimoto et al., 1987; Godshall, 1997; Huang et al., 1998). A ação adoçante inicial da isomaltulose é percebida mais rapidamente e no final há um sabor residual mais fraco se comparado ao da sacarose. Além disso, a isomaltulose apresenta metade da solubilidade da sacarose, o que facilita a sua separação, na etapa de cristalização. A isomaltulose não apresenta aumento de higroscopicidade, nem inversão com a adição de ácido cítrico, como ocorre com a sacarose, indicando que a isomaltulose facilita a manutenção de doçura e sabor em alimentos e bebidas acidificados. Quando utilizada, em alimentos, como substituto da sacarose na produção de balas e chocolates, não foram observadas diferenças na doçura (Takazoe, 1989).

Verificou-se que a isomaltulose é significativamente menos cariogênica do que a sacarose, pois não é fermentada pela maioria das bactérias e leveduras presentes na microbiota oral. A isomaltulose não é fermentada pela bactéria *Streptococcus mutans*, principal bactéria envolvida no aparecimento de cáries dentárias, devido ao consumo de sacarose (Linke, 1987).

Vários autores (Maki et al., 1983; Ooshima et al., 1983; Topitsoglou et al., 1984; Sasaki et al., 1985; Ziesenitz et al., 1987), observaram que a produção de ácido e glucana insolúvel por microrganismos dos biofilmes dentários foi menor a partir de isomaltulose do que a partir de sacarose, demonstrando que a isomaltulose pode ser usada como um substituto de sacarose por reduzir a incidência de cáries. No trabalho de Lingstrom et al. (1997), foi constatado que o uso disseminado de dentifrícios fluoretados e açúcares não acidogênicos tem sido

apontado como o principal fator de redução de cáries dentárias em crianças finlandesas e suíças e sugeriu-se a associação de isomaltulose e xilitol como uma combinação promissora na diminuição de cáries dentárias.

Em estudos com animais, verificou-se que a isomaltulose é hidrolisada pela isomaltase do complexo sacarase-isomaltase localizado no intestino delgado e absorvida como glicose e frutose (Takazoe et al., 1985). Porém, foi verificado que a digestibilidade e a absorção ocorrem de forma mais lenta do que a sacarose. Segundo Kashimura et al. (1996), a digestibilidade da isomaltulose corresponde a 1/5 da sacarose. De acordo com Cheetam (1987), a concentração plasmática de insulina após ingestão de isomaltulose foi menor quando comparada com sacarose, dando a possibilidade de aplicação da isomaltulose em produtos esportivos, dietéticos e como excipiente de comprimidos. Este dissacarídeo, em estudos feitos com animais, não mostrou efeitos teratogênico, mutagênico ou qualquer tipo de toxicidade, portanto sendo considerado seguro para a utilização em alimentos (Takazoe 1989, Lina et al., 1997; Jonker et al., 2002).

Tratando-se a isomaltulose com pH ácido e aquecimento, obtém-se oligômeros baseados em isomaltulose, que consistem de uma mistura de isomaltulose (50,5%) e seus condensados: tetrassacarídeos (28,4%), hexassacarídeos (12,9%), octassacarídeos (6,2%) e monossacarídeos (2%). Esses produtos podem ser utilizados como agentes pré-bióticos que estimulam seletivamente a proliferação e atividade de certas espécies da microbiota intestinal, as bifidobactérias e os lactobacilos, que proporcionam benefícios para a saúde. Tais oligossacarídeos não são completamente digeridos no intestino delgado e, assim, conseguem atingir o intestino grosso onde funcionam como substrato de fermentação para as bifidobactérias ali presentes. Essa microbiota desejável protege o hospedeiro, antagonizando o crescimento de microrganismos

patogênicos, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, biodisponibilizando minerais como o cálcio e o ferro e auxiliando na digestão. (Kashimura et al., 1996; Cummings et al., 2001).

A isomaltulose é utilizada na produção do isomalte (uma mistura equimolar de α -D-glicopiranosil-1,6-manitol e α -D-glicopiranosil-1,6-sorbitol). Esse açúcar-álcool é obtido por hidrogenação da isomaltulose em solução aquosa neutra. Em relação a outros polióis o isomalte tem a vantagem de ser muito menos higroscópico e possuir melhores propriedades organolépticas. A maioria dos polióis pode ser consumida por diabéticos sem aumento significativo da glicemia, por serem apenas parcialmente hidrolisados e absorvidos no intestino delgado. O isomalte tem sido utilizado na indústria de alimentos e farmacêutica pela combinação do sabor natural adocicado, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas. (Khan, 1994; Ndindayno et al., 1999).

O aumento do consumo de alimentos doces contendo sacarose e glicose tem levado a uma ingestão excessiva de açúcar, gordura e energia, implicando no aumento da obesidade e doenças metabólicas associadas à obesidade. O consumo de alimentos doces com menor quantidade de açúcares ou livre de açúcares apresentam-se como alternativa para a redução de calorias. Os polióis como isomalte, sorbitol, manitol, xilitol, maltitol e lactitol têm sido aplicados na produção de doces, chocolates, gomas de mascar e balas em substituição a sacarose, sendo o valor calórico dos polióis de 2,4 Kcal/g e o da sacarose de 4 Kcal/g (Zumbé et al., 2001).

A isomaltulose é produzida pelas indústrias Mitsui Sugar Company (Japão), e Tate & Lyle (Inglaterra), sendo comercializada como Palatinose[®] e Lylose[®], respectivamente. Em 1998 a produção mundial de isomaltulose foi estimada em 35.000 toneladas por ano e seu preço era de aproximadamente US\$

2/Kg. Em 2001 essa produção aumentou para 50.000 toneladas por ano. Já a produção de isomalte foi estimada em aproximadamente metade da produção de isomaltulose, ou seja, 20.000 a 25.000 toneladas por ano, com preço de US\$ 3/Kg (Lichtenhaler, 1998).

2.3. Conversão de sacarose em isomaltulose

A conversão de sacarose para isomaltulose pode ser realizada através dos sistemas enzima livre (Lund e Wyatt, 1973; McAllister et al., 1990; Park et al., 1992; Park et al., 1996), células livres (Schiweck et al., 1974; Heikkila, 2000) e células imobilizadas (Bucke e Cheetham, 1982; Cheetham et al., 1982; Shimizu et al., 1982; Lantero, 1983; Cheetham et al., 1985; Hashimoto et al., 1987; Tsuyuki, 1992; Sarkki et al., 1999; Moraes, 2002; Kawaguti, 2003).

A principal vantagem do uso de células imobilizadas em comparação com o uso de sistemas de enzima livre ou células livres consiste na redução do custo do processo, devido à eliminação das etapas de extração e purificação das enzimas, do uso contínuo de biocatalisador e de um sistema com menor custo para separação das células do produto final (Akin, 1987).

A técnica de imobilização celular permite maior seletividade das reações causada pela permeabilidade alterada da membrana celular, permitindo assim a passagem dos substratos para o interior da célula por meio de uma via particular, que não podem penetrar na célula normal e/ ou o aumento de rendimento e estabilidade dos produtos (Beaumont et al., citado por Derwakos & Webb, 1991).

As células imobilizadas em matriz hidrogel ficam mais protegidas das condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos e compostos tóxicos. Processos contínuos podem ser operados com uma alta

densidade celular, sem a perda de células microbianas mesmo em altos valores de diluição, o que resulta em um reator de alta produtividade (Park e Chang, 2000). A concentração elevada de biomassa dentro das partículas de células imobilizadas pode levar a um aumento das taxas de reação e também permite a redução do volume e versatilidade na escolha dos reatores (Luong et al., 1984).

Cheetham et al. (1985), testaram várias técnicas de imobilização celular: alginato de cálcio, DEAE-celulose, poliacrilamida, κ -carragena e ágar. Todas as técnicas foram significativamente menos estáveis do que a do alginato, que se mostrou um método simples e barato.

A popularidade do uso de alginato de cálcio para o encapsulamento de células se deve a vários fatores, entre eles, não é tóxico, sendo aceito como aditivo em alimentos, é termoestável podendo ser esterilizado, o processo de imobilização é rápido, as células permanecem vivas por um longo tempo porque a imobilização é efetuada em condições muito brandas e também as células imobilizadas ficam protegidas de contaminação (Coughlan et al., 1988).

As esferas de alginato são facilmente produzidas em larga escala, sem a necessidade de equipamentos sofisticados. Geralmente as células são homogeneizadas com a solução de alginato e depois gotejadas em uma solução contendo cátions multivalentes tais como cálcio, bário, estrôncio ou alumínio. Por gelatinização, as esferas são instantaneamente formadas, encapsulando as células dentro da estrutura tridimensional do gel. As esferas são facilmente dissolvidas em condições brandas e as células regeneradas. As poucas limitações do método consistem no uso de substâncias quelantes de cátions, pois provocaria uma desestabilização do gel. Portanto tampões contendo citrato ou fosfato, que possuem grande afinidade pelo cálcio são de uso limitado (Akin, 1987).

No trabalho de Ogbonna et al. (1989), foi estudada a influência de vários fatores no processo de imobilização de células de *Sacharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio como: concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, tempo de gelificação e concentração inicial de células. Os autores verificaram a influência da concentração de alginato (0,5% a 4%) na resistência mecânica das esferas de células imobilizadas, observando o número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Verificou-se que esferas obtidas com 2% de alginato apresentaram menos rompimento, não ocorrendo diferenças significativas entre 1% e 2% de alginato. As esferas preparadas com alginato 0,5% apresentaram mais rompimentos. Segundo os autores, concentrações elevadas de alginato (4%), causaram problemas de viscosidade e resultaram em esferas com difusão deficiente, além de dificultarem a homogeneização com a suspensão celular, resultando em esferas com diferentes concentrações celulares. No estudo da influência da concentração de cloreto de cálcio (0,05 M a 0,3 M) na resistência mecânica das esferas, também foi determinado o número de esferas rompidas após o processo fermentativo. Notou-se que a quantidade de cálcio necessária para gelatinização das esferas é muito pequena e que a concentração de cloreto de cálcio tem pouca influência nas características de difusão das esferas. Também foi estudada a possibilidade da liberação de cálcio ocasionar o rompimento das esferas e os autores concluíram que o crescimento das células no interior das esferas e a formação de gás carbônico contribuem muito mais para o rompimento das esferas do que a liberação de cálcio. Os autores também estudaram a influência do tempo de incubação das esferas na solução de cloreto de cálcio. Observou-se que a estabilidade do gel foi melhor nas esferas que tiveram um maior tempo de gelificação, não ocorrendo diferenças após 22 horas de incubação. No estudo da influência da concentração inicial de células na resistência mecânica das esferas, observou-se que concentrações iniciais de células muito altas resultaram em alta porcentagem de esferas rompidas. Os autores concluíram que provavelmente com o grande número de células acumuladas no centro das esferas, ocorreu uma

maior formação de gás carbônico, prejudicando a difusão do gás através delas, levando a um aumento da pressão interna do gás e conseqüente rompimento das esferas.

Chang et al. (1996), utilizaram 0,1% de Tween 20 durante o encapsulamento de células de *Sacharomyces cerevisiae* em alginato, visando prevenir a ruptura das esferas devido à produção de gás carbônico pelo processo fermentativo.

Tate & Lyle (1981), estudaram a imobilização de células de *Erwinia rhapontici* em alginato de cálcio e verificaram que a concentração de células deve situar-se entre 10% e 40%. Foi obtido melhor resultado na imobilização do microrganismo utilizando-se concentração celular igual a 20% (p/v). Os autores verificaram a influência da concentração de sacarose (12,5% a 60%) na atividade e estabilidade das células de *Erwinia rhapontici* imobilizadas em uma concentração celular de 20% (p/v) em alginato de cálcio 5% (p/v). As esferas obtidas foram empacotadas em uma coluna de 30 cm de comprimento por 5 cm de diâmetro e uma solução de sacarose foi bombeada através da coluna num fluxo de 0,01 ecv/h (volume de coluna por hora) e a temperatura foi mantida a 30°C. Nessas condições experimentais os autores verificaram que altas concentrações de sacarose (ao redor de 40%) diminuíram a atividade da célula imobilizada, devido ao efeito inibitório, mas em compensação aumentaram a estabilidade da mesma, o que resultou em aumento da produtividade da coluna. Além disso, altas concentrações de sacarose tendem a inibir a divisão celular, prevenir a contaminação microbiana e tornar mais fácil a recuperação do produto, pois diminui o volume do líquido processado. Segundo Cheetam (1987), a pureza da sacarose também é um fator importante para aumentar a atividade e estabilidade das células imobilizadas.

Takazoe (1989), estudou a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando células imobilizadas em solução de alginato de cálcio das linhagens de *Protaminobacter rubrum* e *Serratia plymuthica*. O tratamento dos grânulos com polietilenoimina, seguido de glutaraldeído, estabilizou a enzima imobilizada em alginato, aumentando a sua meia-vida de forma expressiva. De acordo com Sarkii (2000), pode-se otimizar a imobilização celular pela adição de agentes de reticulação, como o glutaraldeído, e agentes flocculantes, como o ácido tânico e a polietilenoimina, pois se verificou que a flocculação aumenta a conversão e prolonga a meia vida do sistema imobilizado.

Em outro estudo para obtenção de isomaltulose a partir de transformação enzimática de sacarose por células de *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapontici* imobilizadas em DEAE-celulose modificada foi verificado que a conversão é influenciada pela temperatura, concentração e fluxo de substrato através da coluna. Temperaturas na faixa de 35°C a 45°C inativaram parcialmente e temperaturas superiores à 55°C inativaram totalmente as células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum* após 24 horas. Foi obtida uma conversão maior de sacarose em isomaltulose (79%), utilizando-se coluna empacotada com células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum* a 30°C e com solução 25% de sacarose, adicionada em fluxos lentos. Verificou-se também que a conversão de sacarose em isomaltulose diminuiu em função do tempo. As células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum* foram restauradas pela alimentação da coluna com um meio de cultivo estéril fresco, posteriormente lavou-se a coluna com água estéril, até que a cor original do eluente da coluna fosse alcançada (Xyrofin, 2000).

No trabalho de Börnke et al. (2001), foi descrito a clonagem e caracterização do gene envolvido no metabolismo de isomaltulose de *Erwinia rhapontici*, que foi denominado gene *pal*, usando-se uma seqüência previamente descrita da sacarose isomerase. Para confirmar a natureza do gene *pal*, este foi

expresso em *Escherichia coli* que passou a apresentar atividade da sacarose isomerase, com capacidade de conversão de sacarose em isomaltulose. Para explorar o potencial das plantas transgênicas como alternativa para produção de isomaltulose, Börnke et al. (2002), introduziram o gene *pal* que codifica a sacarose isomerase de *Erwinia rhapontici* em batatas. O crescimento das batatas transgênicas foi igual ao das espécies selvagens, pois o gene *pal* foi expresso somente nos tubérculos, o que levou a uma conversão significativa de sacarose em isomaltulose, sem afetar o desenvolvimento das plantas. Esses resultados foram melhores que os obtidos anteriormente, com a expressão dos genes *pal* em toda a planta do tabaco, ocorrendo sérios retardos no crescimento, em consequência do acúmulo de isomaltulose e falta de sacarose como fonte de energia.

Nos trabalhos de Zhang et al. (2002 e 2003), o gene *pall* que codifica a isomaltulose sintase de *Klebsiella* sp LX3 foi clonado e seqüenciado. Descobriu-se que o gene *pall* codifica um peptídeo de 598 aminoácidos. Foram feitos dois trabalhos de melhoramento genético da enzima isomaltulose sintase. No primeiro trabalho (Zhang et al., 2002), fez-se uma mutação em um sítio direcionado da enzima, com substituição de um aminoácido prolina por glutamina e por arginina, para aumentar a termoestabilidade da enzima. Os resultados mostraram que as trocas de ambos aminoácidos ocasionaram aumento da temperatura ótima de atividade da enzima de 35°C para 40°C, aumento da termoestabilidade e também aumento da atividade máxima da enzima de 7%. No segundo trabalho (Zhang et al., 2003) fez-se uma mutação de quatro resíduos de aminoácidos em um sítio direcionado da enzima. Essa mutação mostrou que os quatro resíduos de aminoácidos trocados (Arg³²⁵, Arg³²⁸, Asp³²⁷, Asp³²⁹), influenciam a cinética da enzima isomaltulose sintase e a especificidade do produto, ocorrendo aumento da formação de trealulose em 17% a 61% e diminuição da formação de isomaltulose em 26% a 67%.

No trabalho de Moraes (2002), avaliou-se o rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 imobilizadas em alginato de cálcio. Estudou-se o efeito da temperatura (25°C a 35°C) e da concentração de substrato (12,5% a 60%). A variação de temperatura não teve influência significativa no processo de conversão. Já concentrações ao redor de 25% a 35% de sacarose aumentaram a produtividade de isomaltulose e concentrações em excesso de sacarose, ao redor de 40%, afetaram a atividade da célula imobilizada, diminuindo muito a conversão de sacarose em isomaltulose. Foi obtido um rendimento em torno de 50% de isomaltulose, utilizando soluções de sacarose entre 20% a 30 % (p/v) a 35°C.

Kawaguti (2003), estudou a imobilização de células de *Erwinia* sp D12 em alginato de cálcio. Neste trabalho descreveu-se que a solução 1% de alginato de sódio de alta viscosidade da marca Sigma[®] pôde ser substituída por solução 2% de alginato de sódio da marca Synth[®], de menor custo. Utilizando-se uma suspensão 40% de massa celular úmida de *Erwinia* sp 12 e solução 2% de alginato de sódio Synth[®] para imobilização das células foi obtido 74,18% de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação a 30°C.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção do microrganismo

A linhagem *Klebsiella* sp 18 foi cultivada em tubos inclinados de meio de cultura, composto de 60 g/L de sacarose, 40 g/L de peptona, 4 g/L de extrato de carne e 20 g/L de ágar, durante 15 horas, a 30°C. Após incubação foi adicionado vaselina estéril aos tubos de ensaio e as culturas foram mantidas sob refrigeração (8 –10°C), com repicagem a cada dois meses.

3.2. Otimização do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18

Foi estudado o efeito da concentração de melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® no meio de cultivo, com o intuito de aumentar a atividade de glicosiltransferase e diminuir o custo do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase.

A otimização do meio de cultura foi realizada através da metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta (Neto et al., 2001), para a análise dos efeitos das variáveis independentes (melaço de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®) na atividade de glicosiltransferase. Um planejamento fatorial composto central foi utilizado. Os dados foram analisados com uso do programa computacional Statistica®, versão 5.0 (Statsoft®, 1995). Este programa permite simplificar e otimizar os cálculos dos efeitos das variáveis analisadas nas respostas para padronização do meio de cultivo.

3.2.1. Preparação do pré-inóculo

Foram utilizados 17 frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo amostras de 50 mL de meio de cultura composto por diferentes concentrações de melação de cana de açúcar, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], de acordo com o planejamento experimental. Em cada frasco foi inoculada uma alçada de cultura jovem do microrganismo *Klebsiella* sp 18, o qual foi previamente incubado a 30°C, durante 15 horas em tubos inclinados do meio de cultura descrito no item 3.1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (New Brunswick, modelo série 25), a 200 rpm, a 30°C, por 24 horas.

3.2.2. Fermentação

Alíquotas de 5 mL dos pré-inóculos foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL dos respectivos meios de cultura. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, a 30°C, a 200 rpm e a produção de glicosiltransferase intracelular foi determinada após 24 horas de fermentação.

3.2.3. Determinação da atividade de glicosiltransferase no sobrenadante da massa celular sonicada

Após incubação, os meios de cultura foram centrifugados (centrífuga Beckman, modelo J2-21), a 10.000 rpm, por 15 minutos, a 5°C. A massa celular foi lavada duas vezes com água destilada e ressuspendida em 20 mL de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0. A suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a ultrasonicação no aparelho Ultratip Labsonic, Lab Line, por 20 segundos a 180 Watts. Após a lise da parede celular das bactérias, as amostras obtidas foram

centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos, a 5°C. Para a determinação da atividade de glicosiltransferase uma mistura de 450µL da solução de sacarose 4% (p/v) em tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0 e 50 µL de solução enzimática foi incubada em banho-maria a 35°C por 20 minutos (Uekane, 1993). Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1945), utilizando-se glicose como padrão. Para o ajuste do espectrofotômetro Beckman DU 70 foi utilizado um “branco” que não continha enzima na mistura de reação. Este teste foi realizado em duplicata e a absorbância foi medida a 540 nm.

3.3. Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultura e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18

O estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultura e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 foi feito em fermentador de 5 L Newbrunswick Bioflo IIC, utilizando-se meio de cultura otimizado composto de 80 g/L de melaço de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], em diferentes temperaturas variando de 26°C a 35°C.

3.3.1. Preparação do inóculo

Duas alçadas de cultura jovem do microrganismo *Klebsiella* sp 18 em tubo inclinado de meio de cultura descrito no item 3.1, previamente incubado a 30°C, durante 15 horas, foram inoculadas em 3 frascos Erlenmeyers de 250 mL

contendo 100 mL de meio de cultivo otimizado. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 24 horas.

3.3.2. Fermentação

Uma alíquota de 300 mL de pré-inóculo foi adicionada assepticamente em fermentador de 5 L contendo 2,7 L de meio de cultura otimizado previamente esterilizado. A fermentação foi realizada nas temperaturas de 26°C, 28°C, 30°C e 35°C. A agitação e a aeração foram mantidas constantes em 200 rpm e 1 vvm (volume/volume/minuto). Amostras de 20 mL de meio de cultura foram coletadas em diferentes tempos no decorrer da fermentação para determinação do pH do meio de cultivo, crescimento do microrganismo e atividade de glicosiltransferase.

3.3.3. Determinação do pH do meio de cultura, do crescimento do microrganismo e da atividade de glicosiltransferase

O pH do meio de cultivo foi determinado utilizando-se pHmetro MARTE®.

O crescimento do microrganismo foi estimado pela medida da absorbância da suspensão celular em 660 nm (Mallete, 1969). Uma alíquota de 20 mL de meio de cultura foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 15 minutos, a 5°C e a massa celular obtida foi submetida a duas lavagens sucessivas com água destilada. A massa celular lavada foi suspensa em 20 mL de água destilada e uma alíquota dessa suspensão foi diluída para se obter a leitura na faixa de linearidade do método. Para o ajuste do espectrofotômetro foi utilizada água destilada como “branco”.

Para determinação da atividade da glicosiltransferase uma alíquota de 20 mL de meio de cultura foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 15 minutos, a 5°C. A massa celular obtida foi submetida a duas lavagens sucessivas com água destilada e ressuspendida em 10 mL de tampão citrato-fosfato, 0,05 M, pH 6,0. A suspensão celular, resfriada a 5°C, foi submetida a ultrasonicação por 20 segundos a 180 Watts. A atividade de glicosiltransferase foi determinada pela concentração de açúcares redutores no sobrenadante, utilizando-se o método de Somogyi-Nelson (1945), como descrito no item 3.2.3.

3.4. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio

Foi feita uma avaliação do rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio. Estudou-se o efeito da concentração de alginato Synth[®] (2% a 4%), da concentração de massa celular (20% a 40%) e da concentração de substrato (25% a 45%) no processo de conversão de sacarose em isomaltulose.

3.4.1. Produção de massa celular de *Klebsiella* sp 18

A obtenção da massa celular de *Klebsiella* sp 18 foi realizada através de fermentação do microrganismo em fermentador New-Brunswick de 5 litros, utilizando-se 3 litros de meio de cultura otimizado composto de 80 g/L de melaço de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®], como ilustrado na figura 2. A fermentação foi realizada a 28°C, por 8 horas, na qual a agitação e aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 1 vvm. A massa celular foi separada do meio de cultura por

centrifugação a 10.000 rpm, 5°C, por 15 minutos e lavada duas vezes com água destilada.



FIGURA 2: Ilustração da fermentação do microrganismo *Klebsiella* sp 18 em fermentador de 5 litros, utilizando-se meio de cultura otimizado composto de 80 g/L de melação de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®, a 28°C, com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm.

3.4.2 Estudo do efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização de células de *Klebsiella* sp 18 e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

Para a imobilização das células de *Klebsiella* sp 18 foram misturados 100 mL de suspensão celular 20% (20 g de massa celular úmida completada para 100

mL de água destilada esterilizada) com 200 mL de soluções 2%, 3% e 4% de alginato de sódio Synth[®], contendo 0,1% de Tween 80, previamente esterilizadas. A suspensão celular foi homogeneizada com agitador magnético e gotejada em solução esterilizada de cloreto de cálcio 2% (p/v), com auxílio de bomba peristáltica Masterflex L/S multicanal, como ilustrado na figura 3, para formar esferas de aproximadamente 3 mm de diâmetro. Os grânulos de células imobilizadas foram mantidos na solução de cloreto de cálcio 2% por 24 horas sob refrigeração. Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada estéril, para a remoção do excesso de solução gelificante. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.

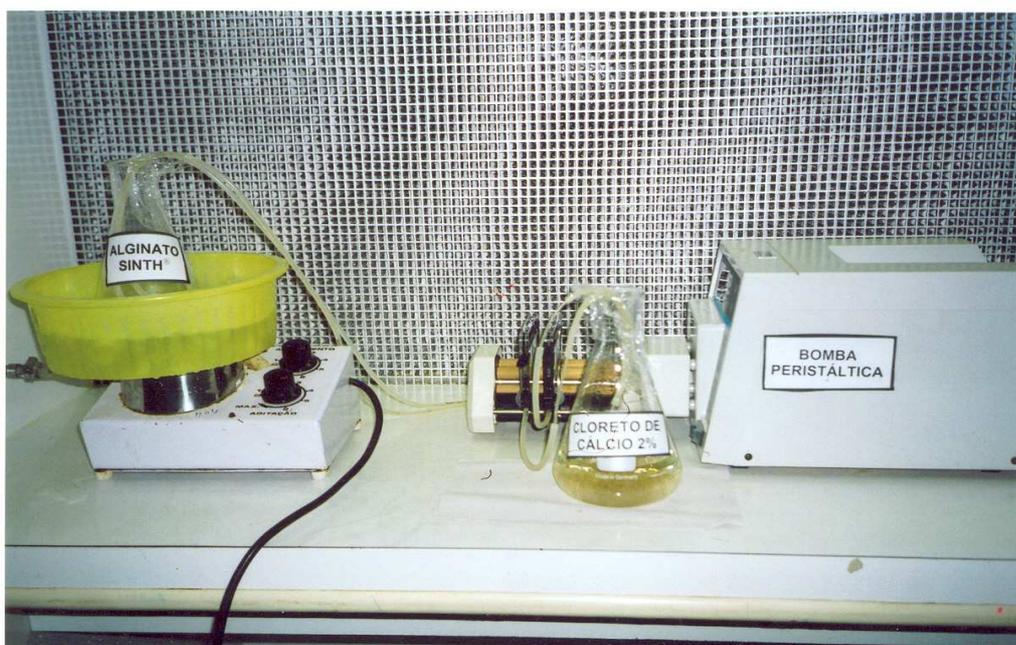


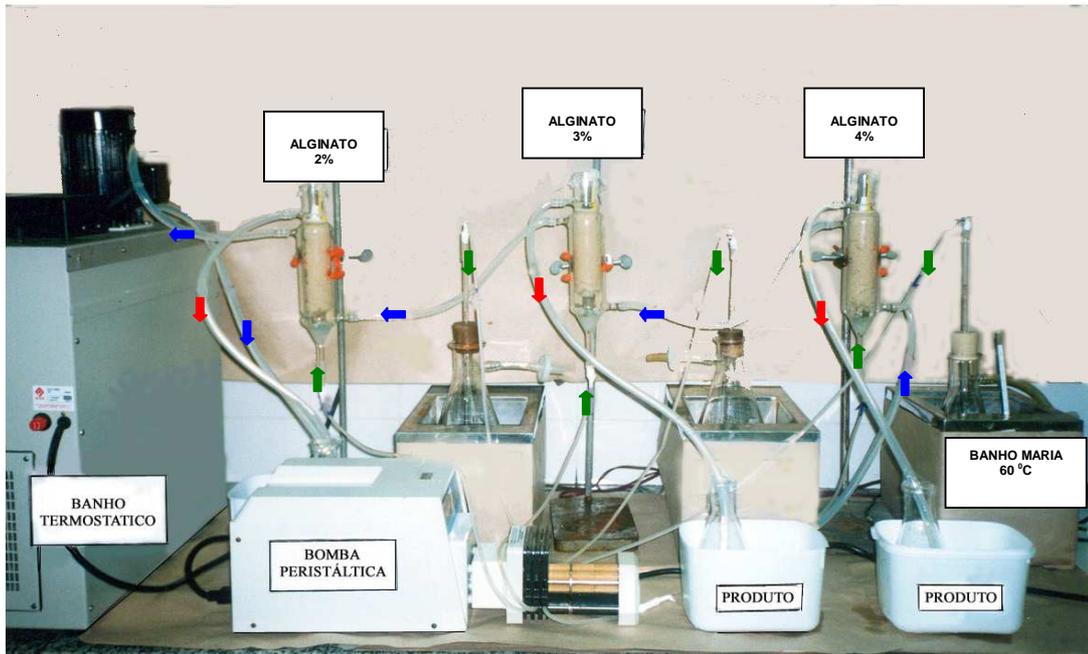
FIGURA 3: Ilustração do processo de imobilização da suspensão de células de *Klebsiella* sp 18 com alginato de sódio Synth[®] em solução de cloreto de cálcio 2% (p/v), com auxílio de bomba peristáltica multicanal.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para colunas encamisadas (150

mm x 30 mm), como ilustrado na figura 4. Solução de sacarose 35% (p/v) foi circulada para cada coluna no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 2 mL/min. Para a preparação da solução de sacarose 35% (p/v), dissolveu-se 224,52 g de açúcar cristal em 500 mL de água destilada quente, recém esterilizada por autoclavagem. Para prevenir contaminação microbiana, a solução de sacarose 35% foi mantida em banho-maria a 60°C. Utilizou-se mangueiras longas para o resfriamento da solução de sacarose 35% até a temperatura ambiente, antes de ser bombeada para as colunas de células imobilizadas. A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e a conversão foi acompanhada por 72 horas. Os carboidratos foram analisados por cromatografia de troca iônica, como descrito a seguir no item 3.4.3.

3.4.3. Análise dos carboidratos por cromatografia de troca iônica

A conversão de sacarose em isomaltulose foi determinada através de cromatografia de troca iônica, utilizando-se um cromatógrafo Dionex DX 600, equipado com pré-coluna carbo Pac PA1 (50 mm X 4 mm), coluna carbo Pac PA1 (250 mm X 4 mm) e detector amperométrico, que se baseia na detecção dos carboidratos por oxidação com eletrodo funcional de ouro. A fase móvel utilizada foi hidróxido de sódio 400 mM degaseificada, com fluxo de 1 mL/minuto em ambiente climatizado. As amostras foram analisadas, através do tempo de retenção, por comparação com padrões de sacarose, isomaltulose, glicose e frutose.



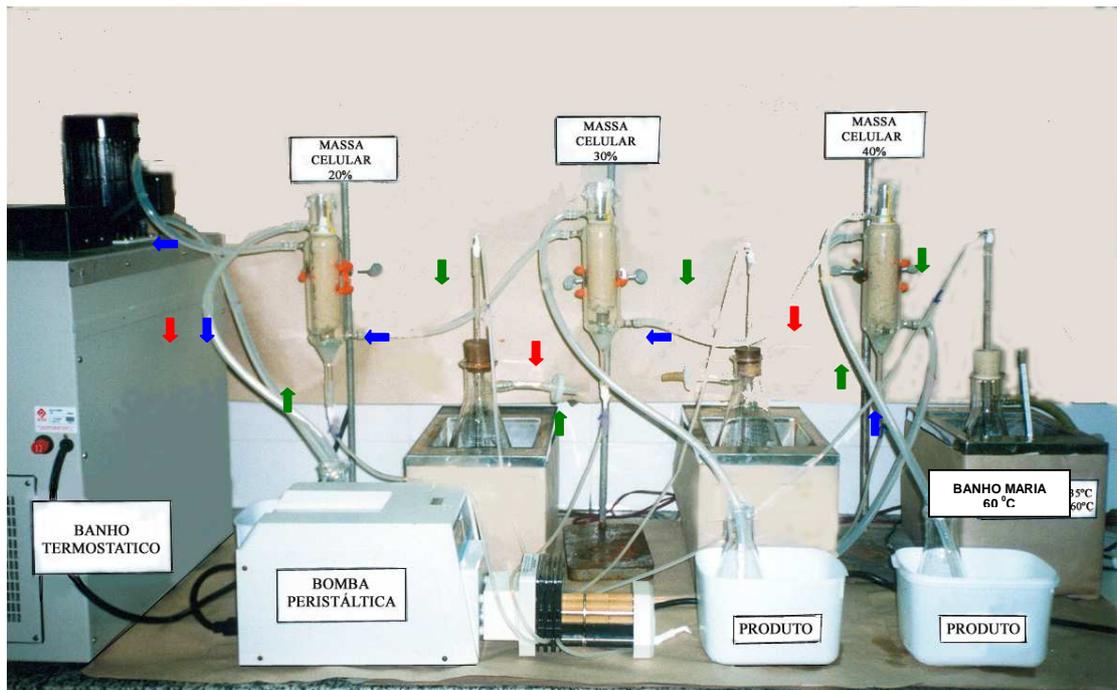
- Fluxo de água
- Fluxo de solução de sacarose
- Fluxo de solução de sacarose convertida

FIGURA 4: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com soluções 2%, 3% e 4% de alginato Synth[®], utilizando-se solução de sacarose 35%.

3.4.4. Estudo do efeito da concentração de células de *Klebsiella* sp 18 na imobilização com alginato de cálcio e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

Suspensões contendo 20%, 30% e 40% (p/v) de células úmidas de *Klebsiella* sp 18, foram misturadas com soluções 2% de alginato Synth[®] contendo 0,1% de Tween 80, previamente esterilizadas, na proporção de volume de 1:2. As misturas foram homogeneizadas com agitador magnético e gotejadas com auxílio de bomba peristáltica em solução esterilizada de cloreto de cálcio 2% (p/v), para a formação de esferas de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro. Os grânulos de células imobilizadas foram mantidos na solução de cloreto de cálcio 2% por 24 horas sob refrigeração. Posteriormente, os grânulos foram lavados com água destilada estéril, para remoção do excesso de solução gelificante. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para colunas encamisadas (150 mm x 30 mm), como ilustrado na figura 5. Solução de sacarose 35% (p/v) foi preparada como descrito no item 3.4.2 e circulada para cada coluna no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 2 mL/min. A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e a conversão foi acompanhada por 72 horas. Os carboidratos foram analisados por cromatografia de troca iônica como descrito no item 3.4.3.



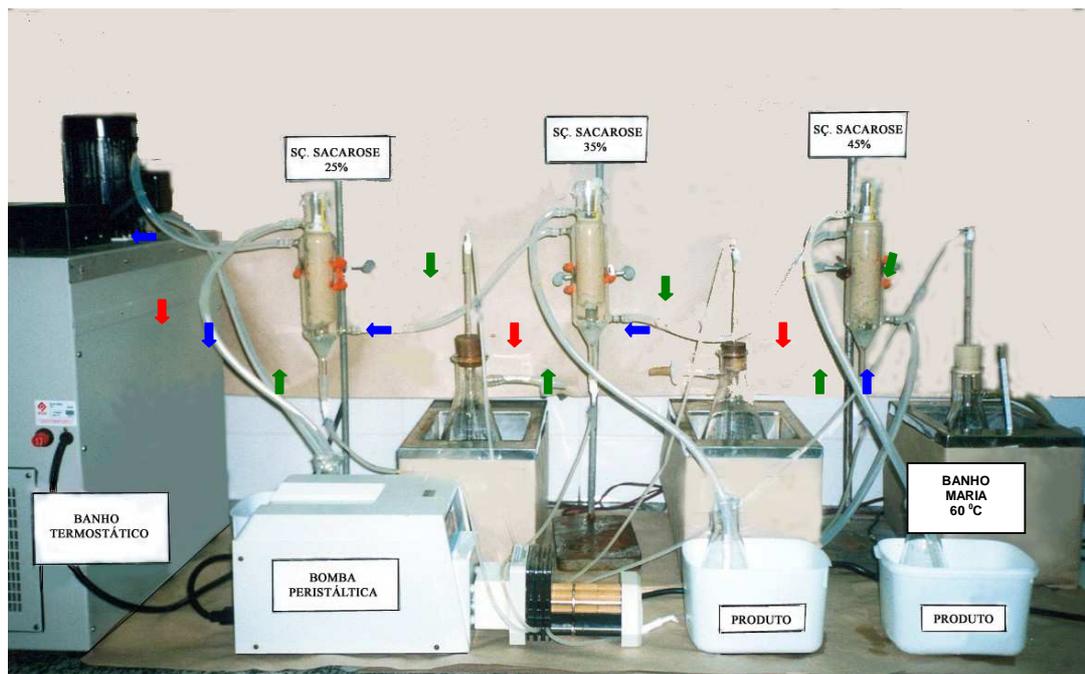
- Fluxo de água
- Fluxo de solução de sacarose
- Fluxo de solução de sacarose convertida

FIGURA 5: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato Synth® 2%, utilizando-se solução de sacarose 35%.

3.4.5. Estudo do efeito da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio em bioreator

Suspensões contendo 20% (p/v) de células úmidas de *Klebsiella* sp 18 foram misturadas com soluções 2% de alginato Synth[®], contendo 0,1% de Tween 80, previamente esterilizadas na proporção de volume de 1:2. As misturas foram homogeneizadas com agitador magnético e gotejadas com auxílio de bomba peristáltica em solução esterilizada de cloreto de cálcio 2% (p/v), para a formação de esferas de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro. Os grânulos de células imobilizadas foram mantidos na solução de cloreto de cálcio 2% por 24 horas sob refrigeração. Em seguida, os grânulos foram lavados com água destilada estéril, para remoção do excesso de solução gelificante. Todas as etapas foram realizadas em condições assépticas.

Para o estudo da conversão de sacarose em isomaltulose amostras de 100 g de células imobilizadas foram transferidas para colunas encamisadas (150 mm x 30 mm), como ilustrado na figura 6. Soluções de sacarose 25%, 35% e 45% (p/v) foram circuladas para cada coluna no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 2 mL/min. Para prevenir contaminação microbiana, as soluções de sacarose 25%, 35% e 45% foram mantidas em banho-maria a 60°C. Utilizou-se mangueiras longas para o resfriamento das soluções de sacarose 25%, 35% e 45% até a temperatura ambiente, antes de serem bombeadas para as colunas de células imobilizadas. A temperatura das colunas foi mantida a 30°C e a conversão foi acompanhada por 72 horas. Os carboidratos foram analisados por cromatografia líquida de troca iônica como descrito no item 3.4.3.



- Fluxo de água
- Fluxo de solução de sacarose
- Fluxo de solução de sacarose convertida

FIGURA 6: Ilustração da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreatores, com suspensões 20% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato Synth[®] 2%, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45%.

3.4.6. Estudo da estabilidade da enzima glicosiltransferase das células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio

A estabilidade da enzima glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18 foi testada utilizando-se bioreator com 100 g de células imobilizadas com alginato de cálcio e adição contínua de solução de sacarose 35% (p/v), preparada como descrito no item 3.4.2, durante 130 horas a 30°C.

Para a imobilização das células de *Klebsiella* sp 18 uma mistura de suspensão contendo 20% (p/v) de células úmidas e solução 2% de alginato Synth[®] foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica em solução de cloreto de cálcio 2% (p/v), para a formação das esferas, com descrito no item 3.4.2.

As amostras de solução de carboidratos foram coletadas após 8, 24, 48, 72, 96 e 130 horas e analisadas por cromatografia de troca iônica como descrito no item 3.4.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18

Utilizou-se melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (ELP) para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18. Os dois planejamentos fatoriais completos para a otimização do meio de cultivo foram realizados como descrito no item 3.2.

4.1.1. Primeiro planejamento fatorial completo

O primeiro planejamento fatorial completo que teve como objetivo avaliar as variáveis independentes melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás[®] e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] em função da variável dependente, no caso a atividade de glicosiltransferase produzida pela linhagem *Klebsiella* sp 18, está apresentado na tabela 1 e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na tabela 2.

Analisando os valores de atividade obtidos, na tabela 1, verificou-se que houve um incremento nos valores de atividade enzimática para os ensaios 1 (8,73 UA/mL), 3 (9,44 UA/mL) e 5 (8,55 UA/mL), ambos contendo concentrações menores de melaço de cana e peptona bacteriológica ou concentrações menores de melaço de cana e extrato de levedura em relação aos ensaios 15, 16 e 17 (repetições do ponto central), onde observou-se valores de atividade enzimática de 4,52 a 4,68 UA/mL.

TABELA 1: Primeiro planejamento experimental completo codificado para estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	8,73
2	+1	-1	-1	3,54
3	-1	+1	-1	9,44
4	+1	+1	-1	4,49
5	-1	-1	+1	8,55
6	+1	-1	+1	3,59
7	-1	+1	+1	6,62
8	+1	+1	+1	4,44
9	-1,68	0	0	6,66
10	+1,68	0	0	3,50
11	0	-1,68	0	8,01
12	0	+1,68	0	5,30
13	0	0	-1,68	4,70
14	0	0	+1,68	4,49
15	0	0	0	4,52
16	0	0	0	4,68
17	0	0	0	4,61

da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18.

TABELA 2: Valores decodificados utilizados no primeiro planejamento fatorial completo no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18.

Nível	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Melaço de cana (g/L)	110,00	130,24	160,00	189,76	210,00
Peptona (g/L)	5,00	11,07	20,00	28,93	35,00
ELP (g/L)	5,00	9,05	15,00	20,95	25,00

A tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase, e a tabela 4 a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,84 e o teste F ($F_{\text{experimental}}$ apresenta valor 1,49 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados satisfatórios a 95% de nível de confiança, e permitem obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

TABELA 3: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito da concentração de melação de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao primeiro planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	4,56	0,05	4,36	4,76
(1) Melação de cana(L)*	-1,65	0,02	-1,75	-1,56
Melação de cana (Q)*	0,32	0,02	0,21	0,42
(2) Peptona (L)*	-2,92	0,02	-0,38	-0,19
Peptona (Q)*	0,88	0,02	0,77	0,98
(3) ELP (L)*	-0,25	0,02	-0,34	-0,15
ELP (Q)	0,15	0,02	0,04	0,25
1L x 2L*	0,38	0,03	0,25	0,50
1L x 3L*	0,37	0,03	0,25	0,50
2L by 3L*	-0,34	0,03	-0,46	-0,22

*parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

TABELA 4: Análise de variância no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao primeiro planejamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	51,49	08	6,44	5,11
Resíduos	10,10	08	1,26	
Falta de ajuste	10,09	05	2,02	
Erro Puro	0,01	02	0,005	
Total	61,60	16		

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

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

A partir da validação dos parâmetros de estudo obteve-se a equação 1 que representa o modelo codificado para atividade de glicosiltransferase e que descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta das variáveis analisadas:

$$\begin{aligned}
 \text{Atividade} = & 4,56 - 1,65.\text{melaço} - 2,92.\text{peptona} - 0,25.\text{ELP} \\
 & + 0,32.\text{melaço}^2 + 0,88.\text{peptona}^2 + 0,15.\text{ELP}^2 + \\
 & 0,38.\text{melaço}.\text{peptona} + 0,37.\text{melaço}.\text{ELP} - \\
 & 0,34.\text{peptona}.\text{ELP}
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

A figuras 7, 8 e 9 mostram os efeitos dos componentes melaço de cana, peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18. Pode-se observar que a atividade enzimática tende a aumentar com a diminuição da concentração de melaço, peptona e ELP. Desse modo, as superfícies de resposta e curvas de contorno indicam que as concentrações de melaço, peptona e ELP devem ser diminuídas para que a produção seja otimizada.

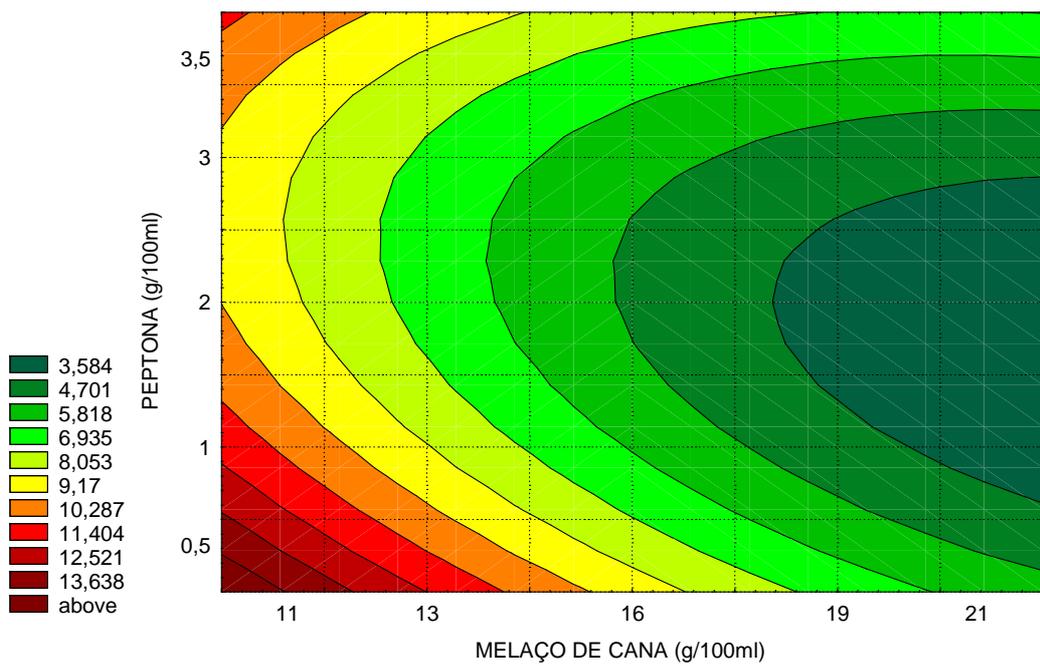
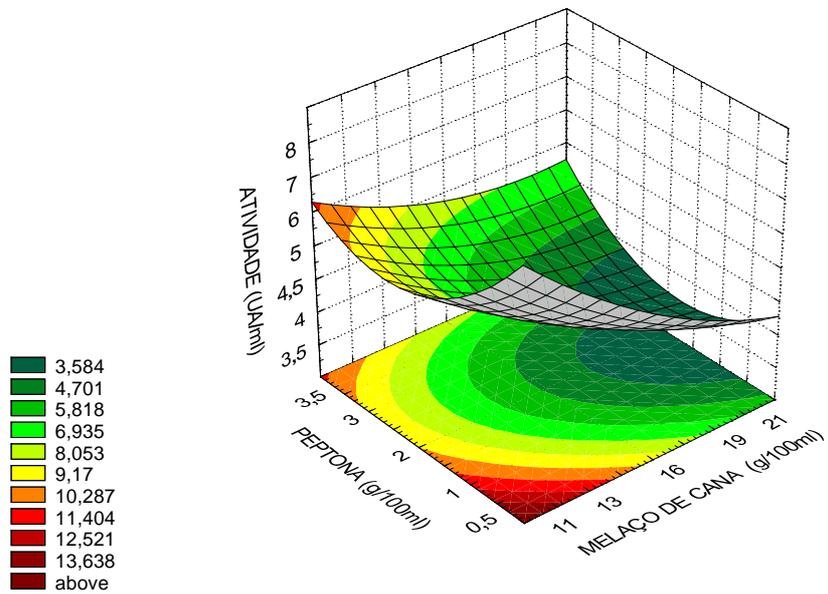


FIGURA 7: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e peptona bacteriológica Biobrás®, referente ao primeiro planejamento.

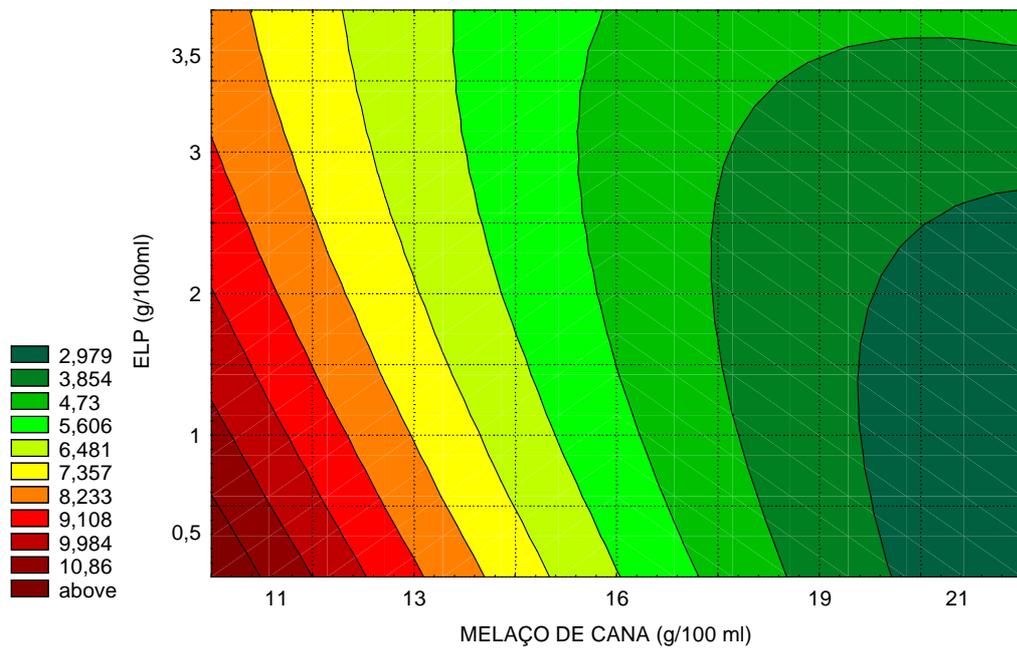
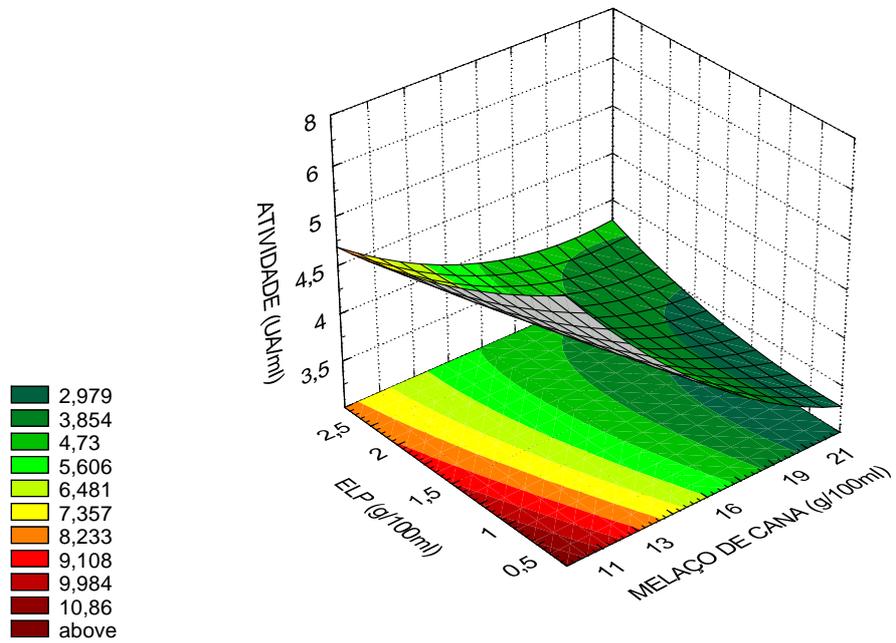


FIGURA 8: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melaço de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao primeiro planejamento.

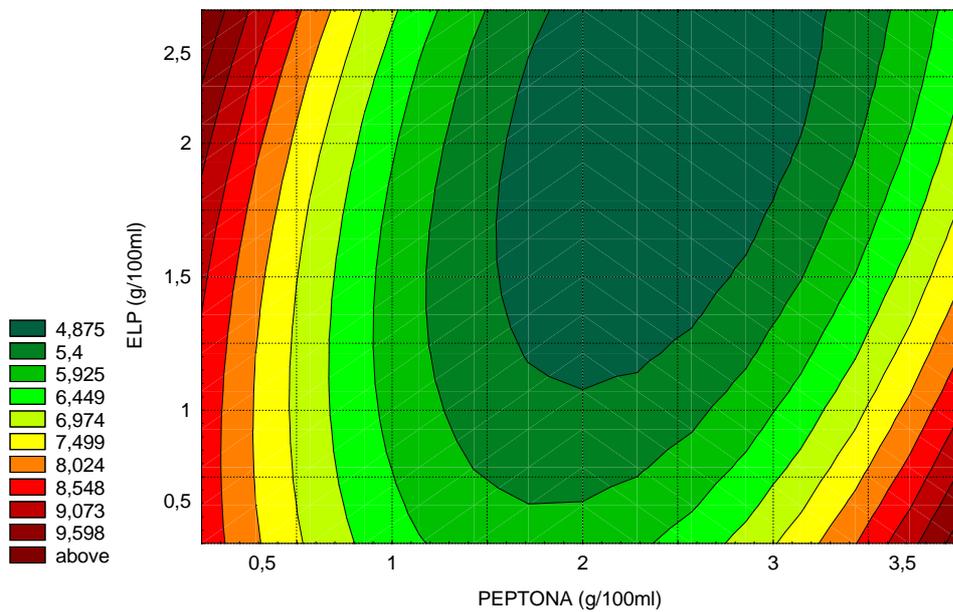
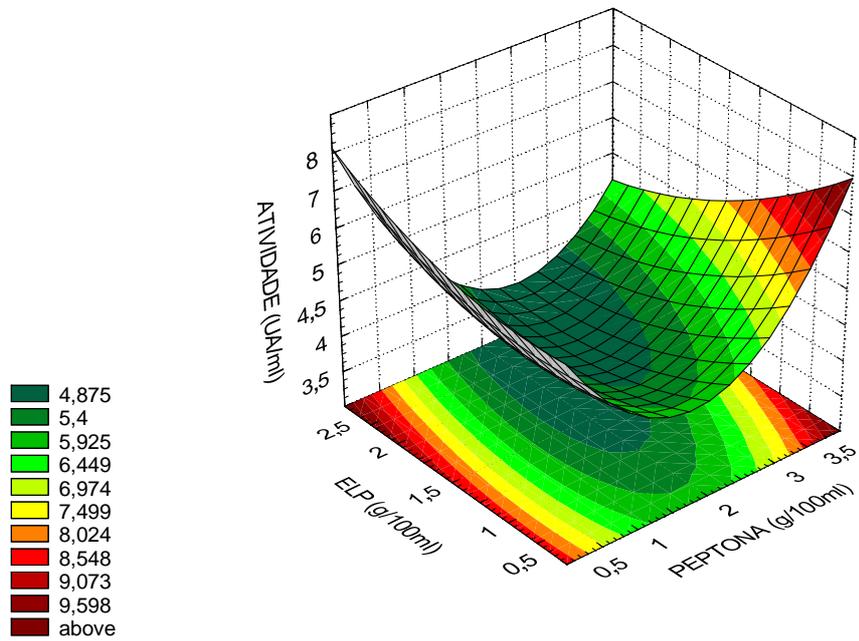


FIGURA 9: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referente ao primeiro planejamento.

4.1.2. Segundo planejamento fatorial completo

O segundo planejamento fatorial completo que teve como objetivo determinar a concentração dos componentes do meio de cultivo melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® para maior produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, está apresentado na tabela 5, e os níveis estudados, com os valores decodificados, encontram-se na tabela 6.

Através da análise da tabela 5 verifica-se que a maior produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 (9,79 a 10,15 UA/mL) foi obtida nos ensaios 15, 16 e 17, utilizando-se meio de cultivo composto de 80 g/L de melaço de cana, 7 g/L de peptona da Biobrás® e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD®.

TABELA 5: Segundo planejamento experimental completo codificado para estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18.

Ensaio	Melaço de cana	Peptona	ELP	Atividade (UA/mL)
1	-1	-1	-1	4,68
2	+1	-1	-1	7,22
3	-1	+1	-1	5,98
4	+1	+1	-1	8,20
5	-1	-1	+1	7,27
6	+1	-1	+1	6,59
7	-1	+1	+1	7,01
8	+1	+1	+1	7,99
9	-1,68	0	0	3,01
10	+1,68	0	0	8,05
11	0	-1,68	0	6,34
12	0	+1,68	0	7,87
13	0	0	-1,68	8,28
14	0	0	+1,68	6,28
15	0	0	0	9,79
16	0	0	0	10,15
17	0	0	0	9,88

TABELA 6: Valores decodificados utilizados no segundo planejamento fatorial completo no estudo do efeito da concentração de melaço de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na atividade de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp 18.

Nível	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Melaço de cana (g/L)	10,00	38,34	80,00	121,66	150,00
Peptona (g/L)	0,00	2,84	7,00	11,16	14,00
ELP (g/L)	0,00	8,10	20,00	31,90	40,00

A tabela 7 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de glicosiltransferase, e a tabela 8 a análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido de 0,88 e o teste F ($F_{\text{experimental}}$ apresenta valor 4,42 vezes maior do que o valor tabelado) podem ser considerados excelentes a 95% de nível de confiança, e permitem obter um modelo codificado que descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

TABELA 7: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito da concentração de melação de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao segundo planejamento.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança -95%	Limite de Confiança +95%
Média*	9,91	0,11	9,45	10,37
(1) Melação de cana (L)*	0,99	0,05	0,77	1,20
Melação de cana (Q)*	-1,46	0,06	-1,70	-1,23
(2) Peptona (L)*	0,44	0,05	0,22	0,66
Peptona (Q)*	-0,90	0,06	-1,14	-0,66
(3) ELP (L)	-0,42	0,05	-0,26	0,17
ELP (Q)*	-0,84	0,06	-1,08	-0,60
1L x 2L	0,17	0,07	-0,12	0,45
1L x 3L*	-0,56	0,07	-0,84	-0,27
2L by 3L	-1,14	0,07	-0,42	0,14

* parâmetros estatisticamente significativos (95% de confiança)

(L) parâmetro linear

(Q) parâmetro quadrático

TABELA 8: Análise de variância no estudo do efeito da concentração de melação de cana, peptona bacteriológica da Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD® (ELP) na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, referentes ao segundo planejamento.

Fonte variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	46,76	06	7,79	11,28
Resíduos	6,93	10	0,69	
Falta de ajuste	6,86	8	0,85	
Erro Puro	0,07	2	0,03	
Total	53,70	16		

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,88$,
 $F_{0,95;6;10} = 2,55$

Após as análises, foi possível obter a equação 2, que representa o modelo codificado para a atividade de glicosiltransferase e que descreve as curvas de contorno e superfícies de resposta das variáveis analisadas.

$$\text{Atividade} = 9,91 + 0,99.\text{melaço} + 0,44.\text{peptona} - 1,46.\text{melaço}^2 - 0,90.\text{peptona}^2 - 0,84.\text{ELP}^2 - 0,56.\text{melaço}.\text{ELP} \quad (2)$$

A figuras a seguir mostram os efeitos dos componentes do meio de cultivo na produção de enzima pela linhagem *Klebsiella* sp 18, com as curvas de contorno e superfícies de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melação de cana e peptona bacteriológica Biobrás® (figura 10), em função da concentração de melação de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD® (figura 11) e em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®(figura 12).

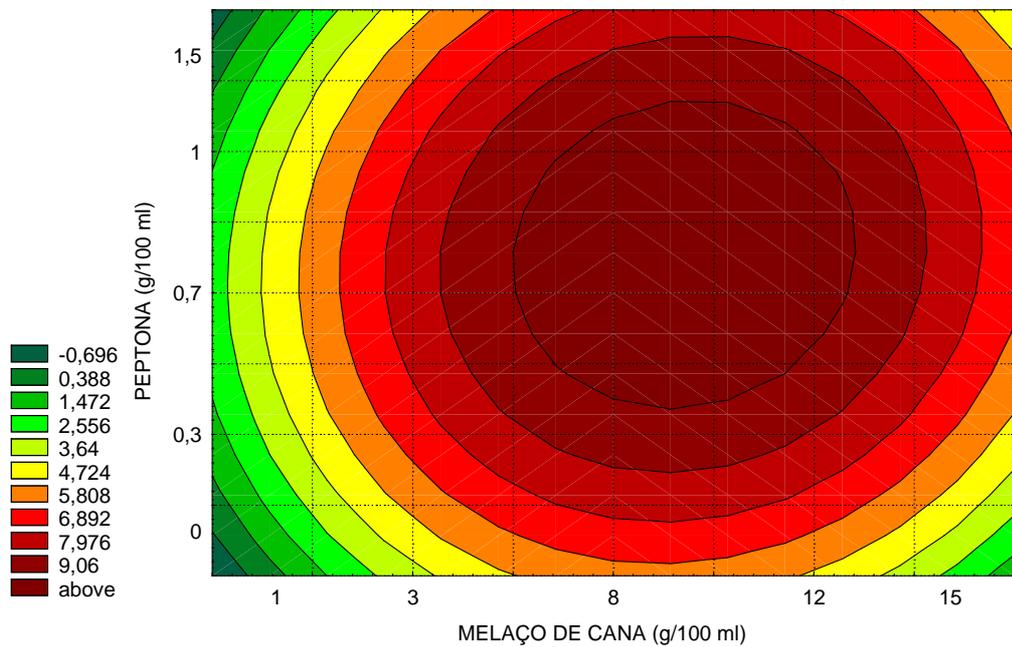
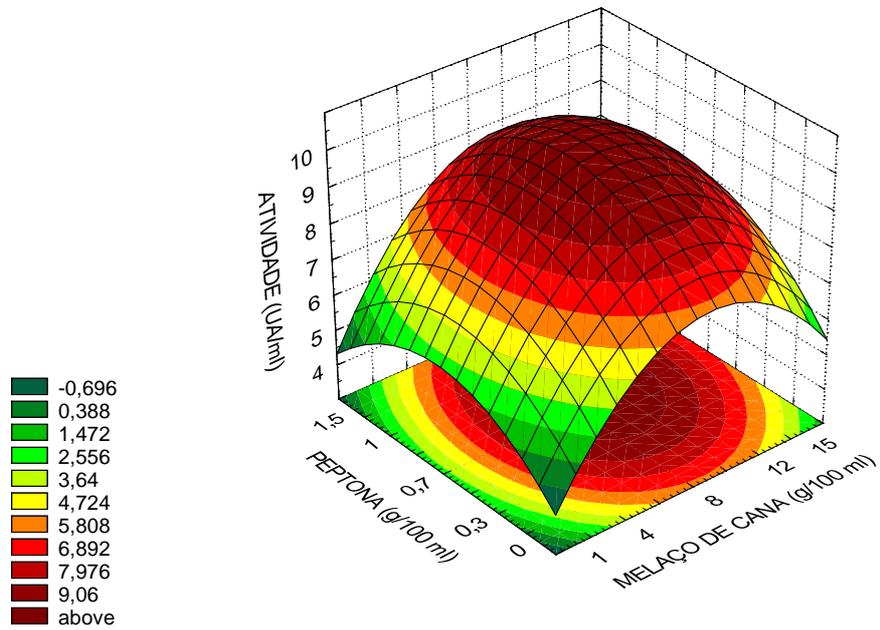


FIGURA 10: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melação de cana e peptona bacteriológica Biobrás®, referente ao segundo planejamento.

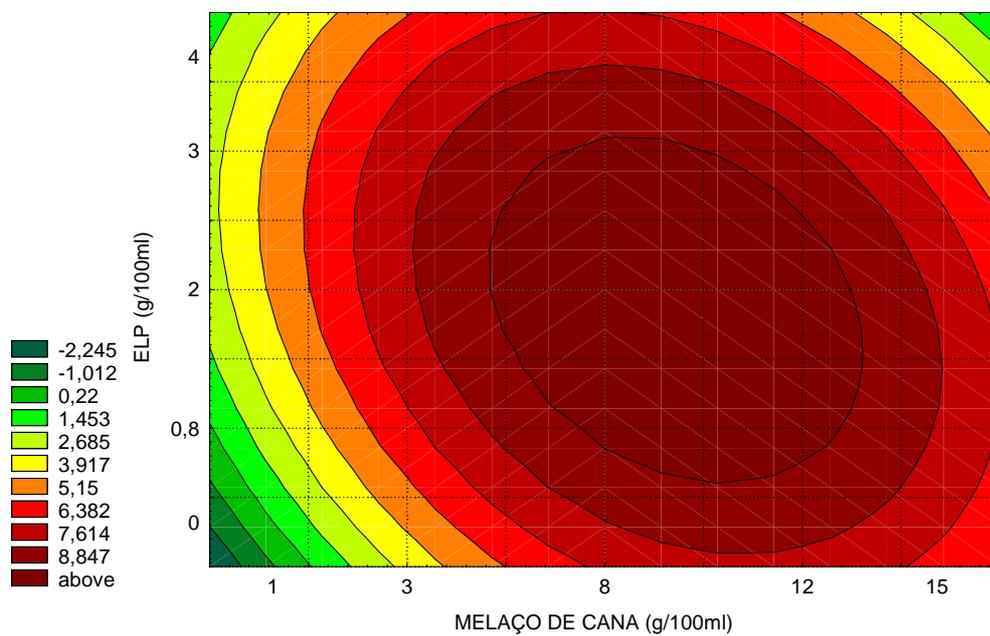
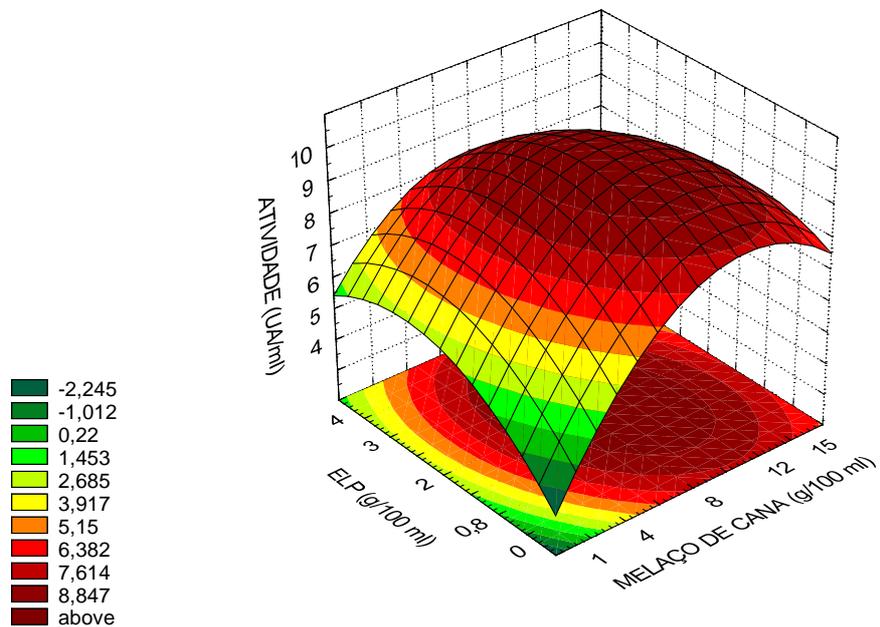


FIGURA 11: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de melação de cana e extrato de levedura Prodex Lac SD[®], referente ao segundo planejamento.

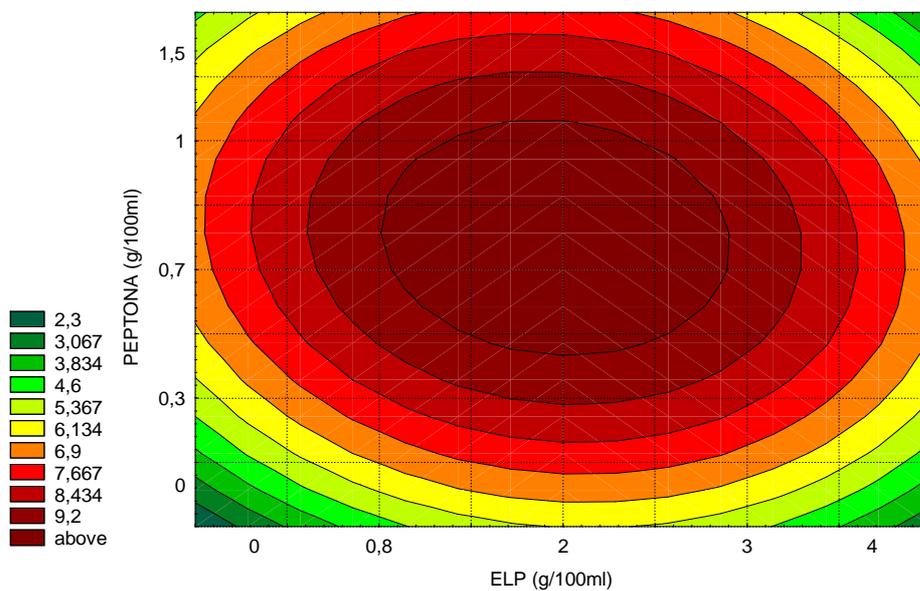
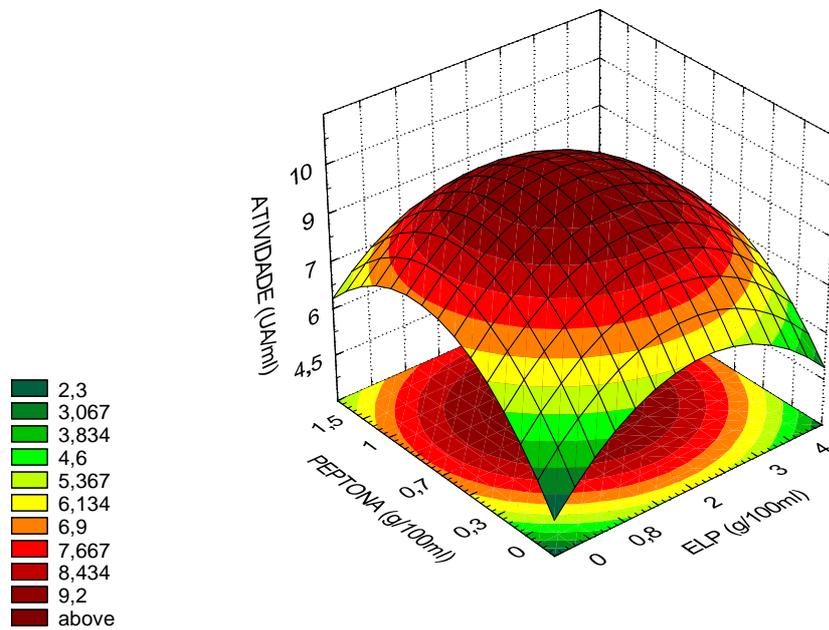


FIGURA 12: Curva de contorno e superfície de resposta para atividade de glicosiltransferase em função da concentração de peptona bacteriológica Biobrás® e extrato de levedura Prodex Lac SD®, referente ao segundo planejamento.

Uekane (1993), estudou a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de 40 g/L de sacarose Ecibra[®], 10 g/L de peptona Difco[®] e 4 g/L de extrato de carne Difco[®]. A autora obteve atividade de glicosiltransferase de 0,17 UA/mL de meio de cultivo após 24 horas de fermentação do microrganismo a 30°C.

No presente estudo a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 foi realizada em meio de cultivo otimizado composto de 80 g/L de melação de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®]. Na fermentação a 30°C, obteve-se atividade de glicosiltransferase de 9,94 UA/mL de meio de cultivo após 24 horas. Notou-se que com a otimização do meio de cultivo a atividade de glicosiltransferase produzida pela linhagem *Klebsiella* sp 18 aumentou aproximadamente 60 vezes em relação ao meio de cultivo utilizado anteriormente por Uekane (1993).

Aparentemente a introdução do melação de cana em substituição a sacarose foi fundamental para os resultados obtidos com o meio de cultivo otimizado. De acordo com Curtin (1983), o melação de cana é formado em termos percentuais por açúcar total 50%, água 20%, substâncias nitrogenadas 8%, cinzas 8%, sais minerais 5% e outros compostos 9%. O melação de cana também contém vitaminas do complexo B, como biotina (0,36 mg/Kg), ácido pantotênico (21 mg/Kg), riboflavina (1,8 mg/Kg) e tiamina (0,9 mg/Kg). Essa composição tornou o melação de cana uma fonte alternativa de carbono no meio de cultivo, que além de ter diminuído os custos de produção de isomaltulose, pois tem valor comercial inferior ao da sacarose, também contribuiu para aumentar a atividade enzimática.

Moraes (2002), otimizou o meio de cultivo composto de 120 g/L de melaço de cana, 40 g/L de peptona bacteriológica da Difco® e 4 g/L de extrato de carne da Biobrás® para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12. A autora obteve atividade de glicosiltransferase de 12,80 UA/mL de meio de cultivo após 15 horas de fermentação do microrganismo a 30°C.

Dando continuidade aos estudos, Kawaguti (2003) descreveu a otimização do meio de cultivo composto de 160 g/L de melaço de cana, 20 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás® e 15 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD® para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp D12. Na fermentação a 30°C o autor obteve atividade de glicosiltransferase de 7,26 UA/mL de meio de cultivo após 15 horas.

Kawaguti (2003) relatou que o custo do meio de cultivo proposto por Moraes (2002) foi estimado em R\$ 15,62/ litro, ou seja, R\$ 1,22/ UA de glicosiltransferase, enquanto que seu meio de cultivo proposto teve custo reduzido para R\$ 7,06/ litro, ou seja, R\$ 0,96/ UA de glicosiltransferase. O custo do meio de cultivo otimizado neste trabalho para a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 foi estimado em R\$ 2,69/ litro, que corresponde a R\$ 0,27/ UA de glicosiltransferase.

TABELA 9: Custo do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase

	Meio de cultivo (g/L)	Atividade de glicosiltransferase (UA/mL)	Custo total R\$/L	R\$/UA
(Moraes 2002)	Melaço cana -120 Peptona Difco® - 40 Extrato carne Biobrás® -4	12,80	15,62	1,22
(Kawaguti 2003)	Melaço cana -160 Peptona Biobrás® -20 Extrato levedura Prodex Lac SD® -15	7,26	7,06	0,96
(neste trabalho)	Melaço cana -80 Peptona Biobrás® -7 Extrato levedura Prodex Lac SD® -20	9,94	2,69	0,27

4.2 Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio de cultivo e produção de glicosiltransferase pela linhagem de *Klebsiella* sp 18 em fermentador de 5 litros a 26°C, 28°C, 30°C e 35°C.

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, em meio de cultivo otimizado composto de melação de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás[®] (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (20 g/L) foi realizado como descrito no item 3.3.

As tabelas 10, 11, 12 e 13 e as figuras 13, 14, 15 e 16 demonstram, respectivamente, a relação entre o tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultivo, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase a 26°C, 28°C, 30°C e 35°C.

Nas fermentações a 26°C, 28°C e 30°C a produção de massa celular e de glicosiltransferase ocorreram na fase exponencial de crescimento da *Klebsiella* sp 18, alcançando atividade máxima da enzima após 8 horas de fermentação de 20,40 UA/mL, 21,78 UA/mL e 21,53 UA/mL, respectivamente, sendo que após 24 horas de fermentação a atividade enzimática diminuiu, respectivamente, para 18,00 UA/mL, 17,00 UA/mL e 13,66 UA/mL. Nota-se que a 35°C houve uma baixa produção de massa celular e de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, alcançando atividade máxima de 5,58 UA/mL após 6 horas de fermentação. Pode-se observar também que houve pequena alteração do pH durante as fermentações, sendo que após 2 horas de fermentação o pH era 5,7 e após 24 horas de fermentação o pH era 5,3.

TABELA 10: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melação de cana (80,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 26°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/ml)	pH
2	2,97	3,21	5,7
4	4,28	8,02	5,6
6	6,26	18,20	5,6
7	6,84	18,96	5,5
8	7,38	20,40	5,4
9	7,55	18,94	5,4
10	7,84	18,59	5,3
12	7,76	18,20	5,3
24	7,63	18,00	5,2

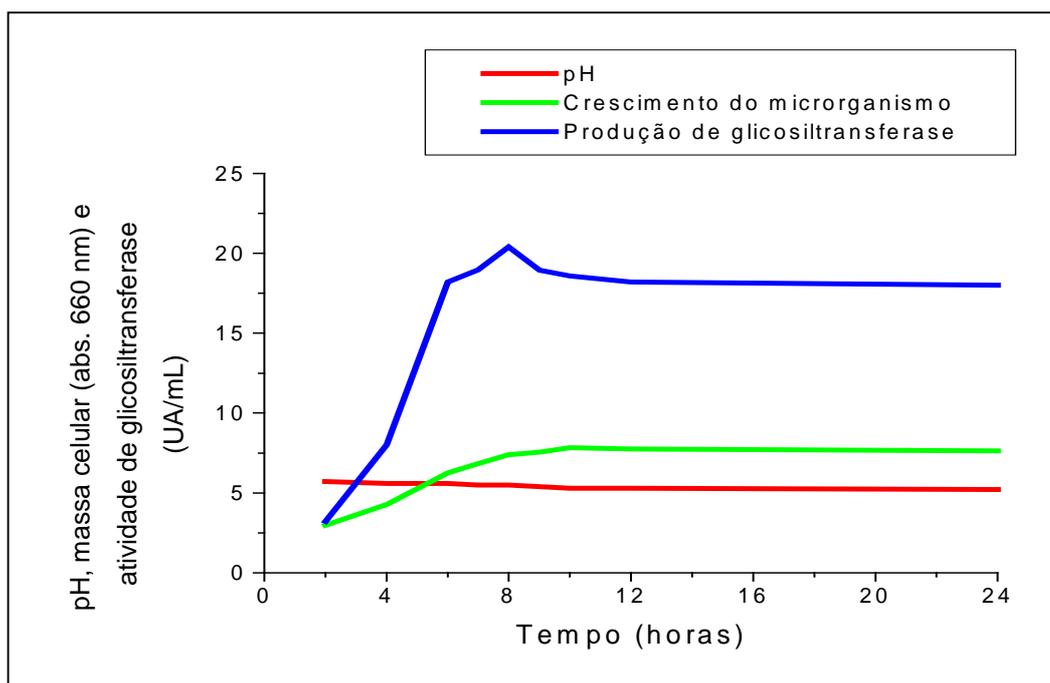


FIGURA 13: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melação de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 26°C.

TABELA 11: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melação de cana (80,0 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 28°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/ml)	pH
2	3,22	4,18	5,7
4	4,71	14,34	5,6
6	6,55	21,53	5,5
7	7,30	20,62	5,5
8	7,98	21,78	5,4
9	7,99	20,20	5,3
10	8,23	19,60	5,3
12	7,84	18,31	5,3
24	7,73	17,00	5,0

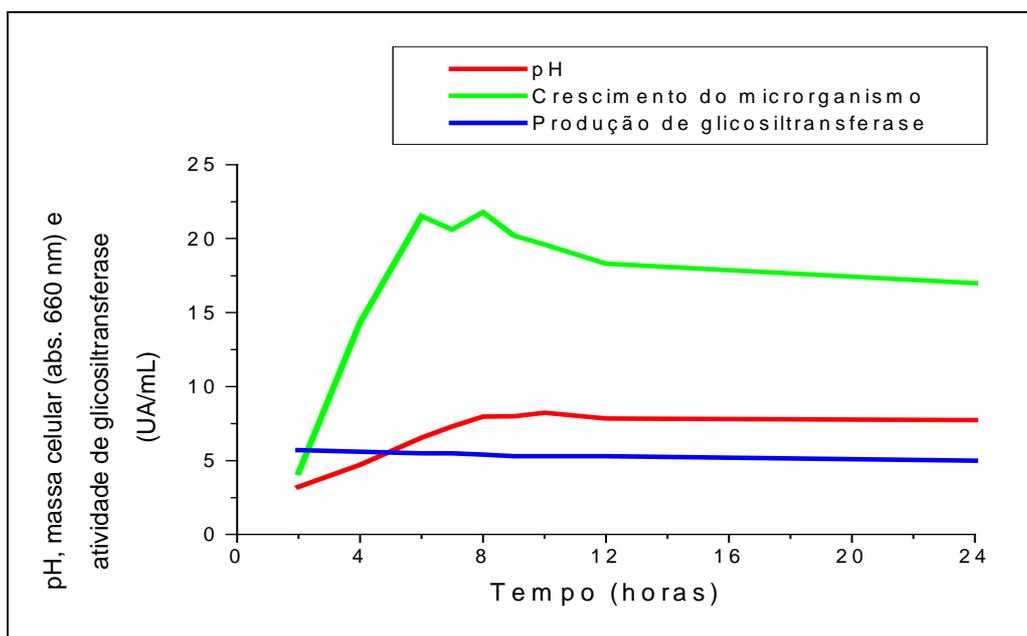


FIGURA 14: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melação de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Pro.dex Lac SD®(20 g/L) em fermentador de 5 L a 28°C.

TABELA 12: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella sp* 18 em meio de cultivo composto de melação de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 30°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/ml)	pH
2	2,56	3,91	5,7
4	4,90	12,76	5,6
6	6,96	21,05	5,5
7	7,52	20,74	5,5
8	7,59	21,53	5,4
9	7,69	20,58	5,3
10	7,77	19,42	5,3
12	7,64	15,05	5,3
24	7,55	13,66	5,3

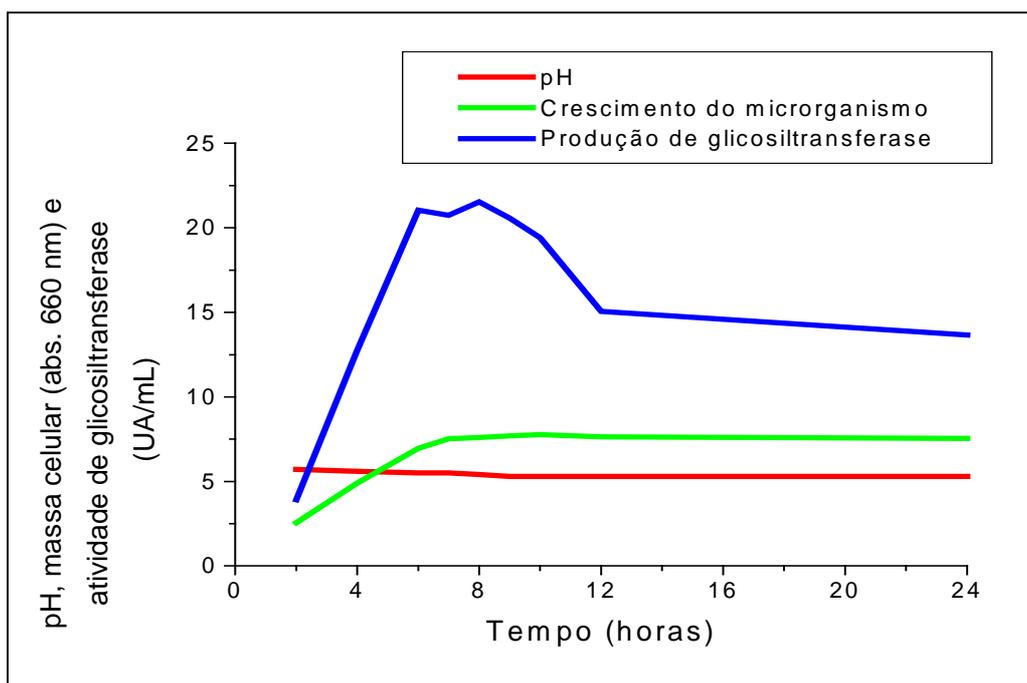


FIGURA 15: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella sp* 18 em meio composto de melação de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 30°C .

TABELA 13: Influência do tempo de fermentação na atividade de glicosiltransferase, crescimento do microrganismo e alteração do pH durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio de cultivo composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 35°C.

Tempo (horas)	Massa Celular (Abs/660 nm)	Atividade (UA/ml)	pH
2	2,70	4,36	5,7
4	4,11	4,99	5,6
6	5,36	5,58	5,5
7	5,66	4,40	5,4
8	5,53	4,37	5,4
9	5,11	4,11	5,4
10	5,03	4,08	5,3
12	5,03	4,06	5,3
24	5,02	3,58	5,3

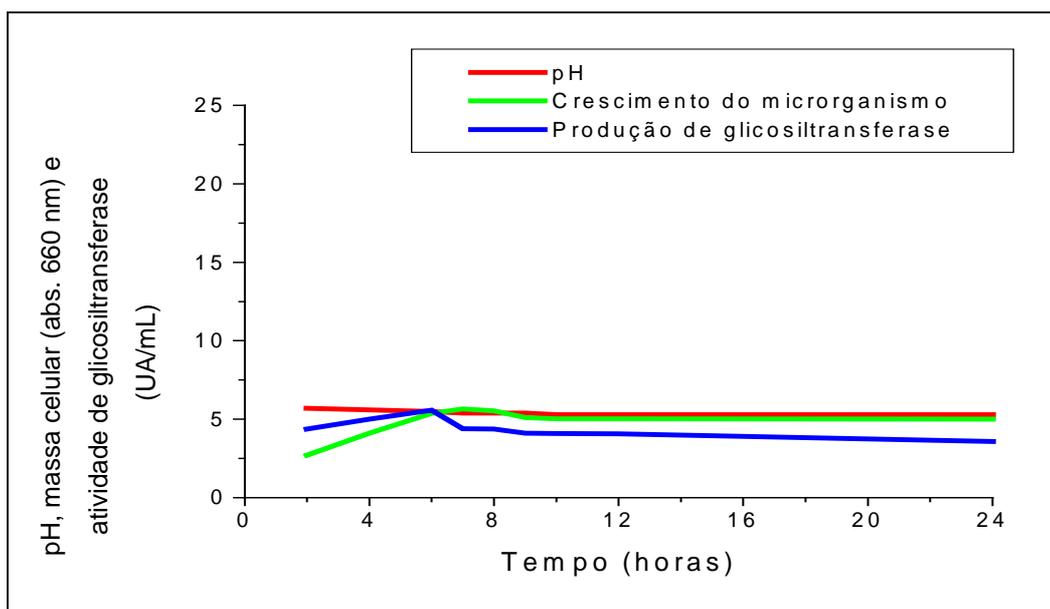


FIGURA 16: Estudo da relação entre tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, produção de glicosiltransferase e alteração do pH do meio de cultivo durante a fermentação de *Klebsiella* sp 18 em meio composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 L a 35°C.

A tabela 14 mostra a produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18 nas temperaturas de 26°C a 35°C, após 8 e 24 horas de fermentação, em meio de cultivo otimizado.

TABELA 14: Produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, em meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L) em fermentador de 5 litros, a 26°C, 28°C, 30°C e 35°C, após 8 e 24 horas de fermentação.

ATIVIDADE DE GLICOSILTRANSFERASE (UA/mL)				
Tempo de fermentação	26°C	28°C	30°C	35°C
8 horas	20,40 UA/mL	21,78 UA/mL	21,53 UA/mL	4,37 UA/mL
24 horas	18,00 UA/mL	17,00 UA/mL	13,66 UA/mL	3,58 UA/mL

Neste estudo do crescimento da linhagem *Klebsiella* sp 18 em fermentador de 5 litros, com meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana (80 g/L), peptona bacteriológica Biobrás® (7 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD® (20 g/L), obteve-se a maior produção de glicosiltransferase após 8 horas de fermentação e nas temperaturas de 28°C e 30°C. Foram obtidas atividades de glicosiltransferase de 21,78 UA/mL e 21,53 UA/mL nas temperaturas de 28°C e 30°C, respectivamente. Observou-se que houve uma queda menor da atividade após 24 horas de fermentação a 28°C do que a 30°C. Assim, a temperatura de fermentação escolhida para continuidade dos estudos foi a de 28°C, na qual se obteve maior atividade de glicosiltransferase após 8 horas de fermentação e uma queda menor de atividade enzimática após 24 horas de fermentação.

Moraes (2002), estudou o cultivo da linhagem *Erwinia* sp D12 em fermentador de 3 litros, utilizando meio otimizado composto de melaço de cana (120 g/L), peptona bacteriológica (40 g/L) e extrato de carne (4 g/L). A autora obteve a maior atividade de glicosiltransferase (15,61 UA/mL), após 8 horas de fermentação do microrganismo a 30°C.

Kawaguti (2003), realizou o estudo do crescimento da linhagem *Erwinia* sp D12 em fermentador de 5 litros, com meio de cultivo otimizado composto de melaço de cana (160 g/L), peptona bacteriológica Biobrás[®] (20 g/L) e extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (15 g/L). O autor obteve a maior atividade de glicosiltransferase (14,61 UA/mL), após 10 horas de fermentação a 26°C.

De acordo com a literatura os microrganismos produtores de glicosiltransferase, geralmente, são de crescimento rápido, em torno de 6 a 20 horas, sendo que a produção máxima dessa enzima ocorre na fase exponencial de crescimento bacteriano, segundo Egerer (1994), em faixas de temperatura ótima que variam de 26°C a 30°C (Huang et al, 1998; Véronèse e Perlot, 1999; Moraes, 2002; Kawaguti, 2003).

4.3. Estudo da conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio

O estudo do efeito da concentração de alginato de sódio e da concentração de massa celular na imobilização de *Klebsiella* sp 18 e da concentração de substrato no processo de conversão de sacarose em isomaltulose foi realizado como descrito no item 3.4.

4.3.1. Estudo do efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização de células de *Klebsiella* sp 18 e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

A tabela 15 e a figura 17 mostram, respectivamente, os valores de conversão de solução 35% (p/v) de sacarose em isomaltulose em bioreator, com suspensão 20% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com soluções de alginato de sódio 2%, 3% e 4%.

Observou-se que a maior taxa de conversão de sacarose em isomaltulose ocorreu utilizando-se células imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio, após 24 horas, com valor de 62,1%, sendo que a conversão diminuiu para 52,6% após 72 horas. Utilizando-se células imobilizadas com solução 3% e 4% de alginato de sódio a conversão de sacarose em isomaltulose, após 24 horas, foi menor, com valores de 47,4% e 51,1%, sendo que após 72 horas a conversão diminuiu para 42,1% e 48,3%, respectivamente.

TABELA 15: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 immobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio

Tempo (horas)	2% Alginato sódio Conversão (%)	3% Alginato sódio Conversão (%)	4% Alginato sódio Conversão (%)
8	37,1	43,7	37,4
24	62,1	47,4	51,1
48	56,0	31,4	45,7
72	52,6	42,1	48,3

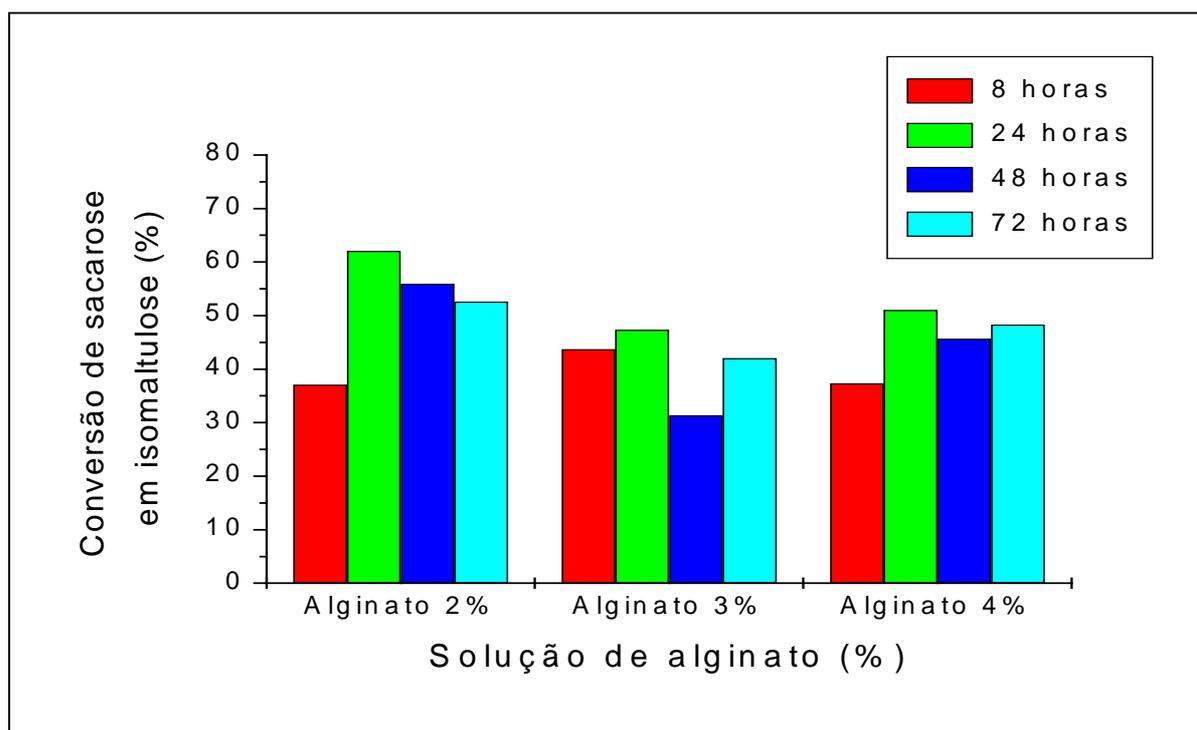


FIGURA 17: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 immobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio.

4.3.2. Estudo do efeito da concentração de células de *Klebsiella* sp 18 na imobilização com alginato de sódio e na conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator

A tabela 16 e a figura 18 mostram os valores de conversão de solução 35% (p/v) de sacarose em isomaltulose em bioreator, com suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio.

Utilizando-se concentrações de massa celular 20% e 30% foi obtido 62,1% e 56,8% de conversão de sacarose em isomaltulose, após 24 horas, sendo que após 72 horas os valores diminuíram, respectivamente, para 52,6% e 52,5%. Verificou-se que utilizando concentração de massa celular 40% ocorreu a maior taxa de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas, com valor de 76,0%, ocorrendo grande queda dos valores no decorrer do tempo, sendo que após 72 horas a conversão era de 18,0%.

TABELA 16: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 35% e suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio

Tempo (horas)	Suspensão de massa celular 20% (p/v) Conversão (%)	Suspensão de massa celular 30% (p/v) Conversão (%)	Suspensão de massa celular 40% (p/v) Conversão (%)
8	37,1	26,0	43,1
24	62,1	56,8	76,0
48	56,0	46,0	31,4
72	52,6	52,5	18,0

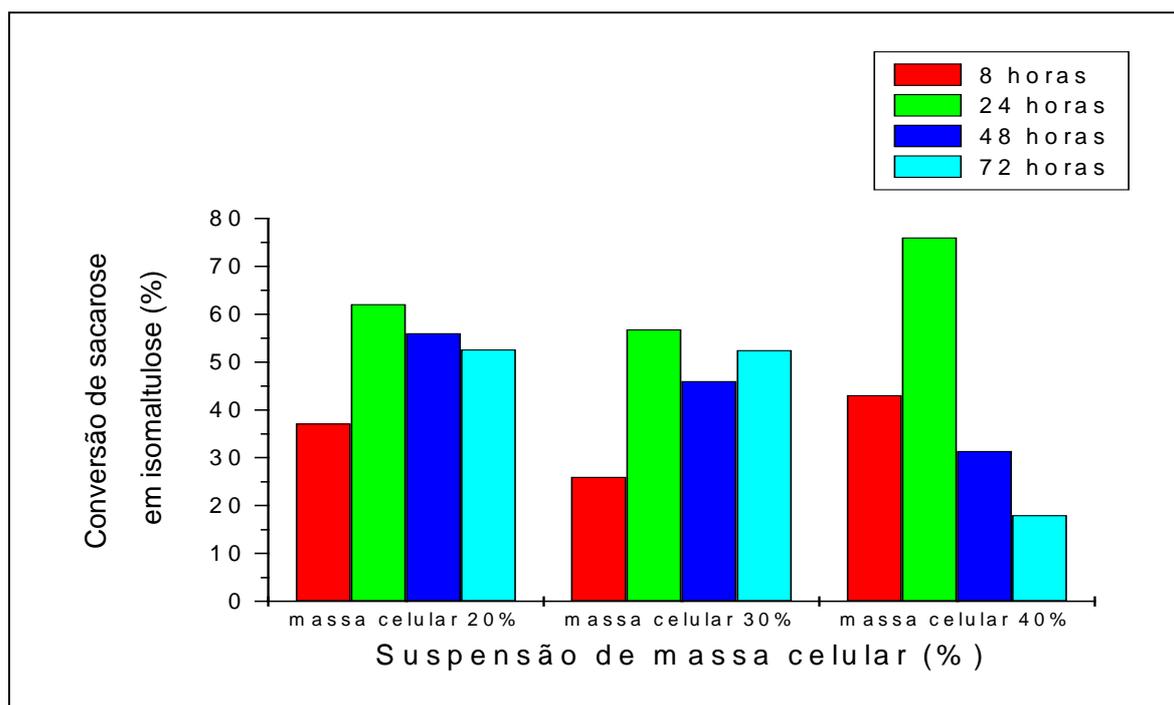


FIGURA 18: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 35% e suspensões 20%, 30% e 40% de massa celular de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio.

4.3.3. Efeito da concentração de substrato na conversão de sacarose em isomaltulose, em bioreator utilizando células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio

A tabela 17 e a figura 19 mostram a conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45% (p/v) e suspensão celular 20% (p/v) de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio.

Utilizando-se solução de sacarose 25% a conversão para isomaltulose foi baixa com valores de 31,4%, após 24 horas e 35,7%, após 72 horas. Usando-se solução de sacarose 35% a conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas, alcançou valor de 62,1%, sendo que após 72 horas o valor diminuiu para 52,6%. Já para a concentração de solução 45% de sacarose a conversão de sacarose em isomaltulose foi inicialmente alta com valor de 70,8%, após 8 horas, ocorrendo queda da conversão para 34,4%, após 24 horas e 38,6%, após 72 horas.

TABELA 17: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45% e suspensão celular 20% (p/v) de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio

Tempo (horas)	Solução de sacarose 25%	Solução de sacarose 35%	Solução de sacarose 45%
	Conversão (%)	Conversão (%)	Conversão (%)
8	13,4	37,1	70,8
24	31,4	62,1	34,4
48	20,0	56,0	35,7
72	35,7	52,6	38,6

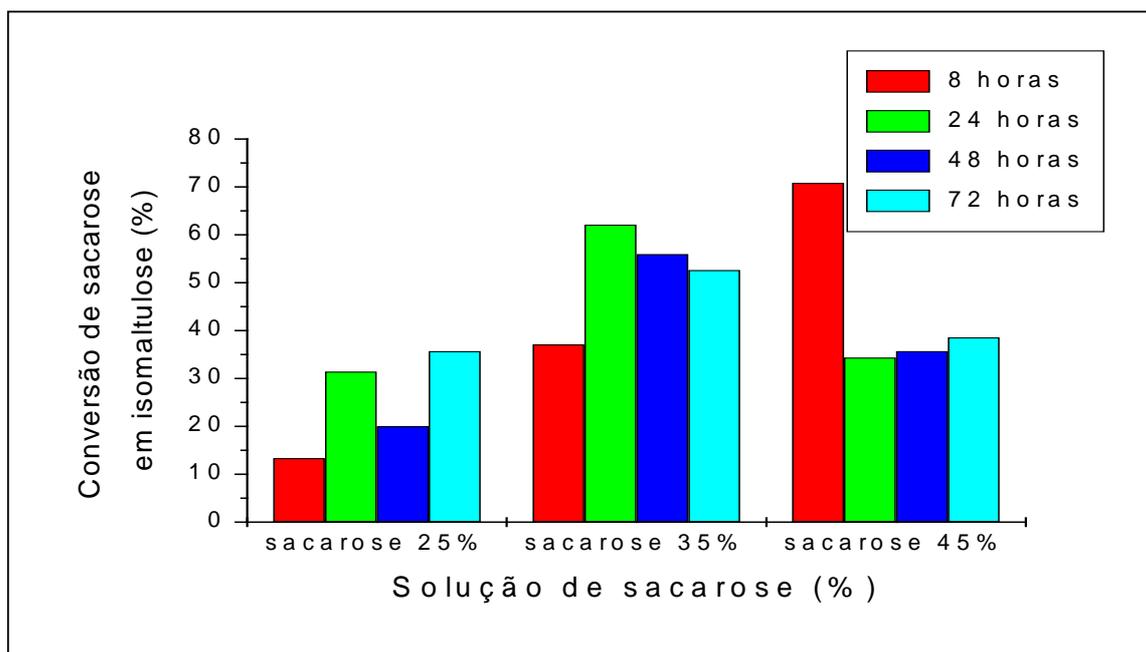


FIGURA 19: Conversão de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se soluções de sacarose 25%, 35% e 45% (p/v) e suspensão celular 20% (p/v) de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio.

Neste estudo de conversão da sacarose em isomaltulose, feita em bioreator, utilizando-se concentração de massa celular 40% de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio e solução 35% de sacarose, ocorreu a maior taxa inicial de conversão de sacarose em isomaltulose, com valor de 76,0%. Utilizando-se concentração de massa celular 20% de *Klebsiella* sp 18 também imobilizada com solução 2% de alginato de sódio e solução 45% de sacarose, a taxa inicial de conversão foi de 70,8%. Contudo, ocorreu grande queda dos valores no decorrer do tempo, sendo que após 72 horas a conversão de sacarose em isomaltulose era apenas de 18,0% e 38,6%, nas duas condições respectivamente descritas.

Utilizando-se suspensão celular 20% de *Klebsiella* sp 18, imobilizada com solução 2% de alginato de sódio e solução 35% de sacarose, obteve-se conversão de 62,1% de sacarose em isomaltulose após 24 horas, sendo que depois de 72 horas o valor era de 52,6%. Devido ao custo significativo para produção de células imobilizadas de *Klebsiella* sp 18, é importante que a produção de isomaltulose se mantenha estável, ao longo do tempo. Observou-se que, nestas condições, houve uma queda menor da conversão de sacarose em isomaltulose após 72 horas, e por isso escolheu-se suspensão celular 20% de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio e solução 35% de sacarose para a continuidade dos estudos.

A tabela 18 mostra a conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se suspensão celular 20% de *Klebsiella* sp 18 imobilizada com solução 2% de alginato de sódio, durante 130 horas.

TABELA 18: Conversão de solução 35% de sacarose em isomaltulose em bioreator, utilizando-se células de *Klebsiella* sp 18 immobilizadas em alginato de cálcio, após 8, 24, 48, 72, 96 e 130 horas.

	TEMPO (horas)					
	8	24	48	72	96	130
Conversão de sacarose em isomaltulose (%)	37,1	62,1	56,0	52,6	24,0	30,0

No estudo da estabilidade da enzima glicosiltransferase com células de *Klebsiella* sp 18 immobilizadas com alginato de cálcio em bioreator, obteve-se rendimento de isomaltulose de 62,1%, após 24 horas e 52,6% após 72 horas de reação a 30°C, utilizando-se 20% de suspensão de células (massa celular úmida/volume) de *Klebsiella* sp 18 immobilizadas em solução 2% de alginato de sódio e solução de sacarose 35% (p/v). Após 130 horas a conversão diminuiu para 30% (tabela 18).

Moraes (2002), avaliou o rendimento de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose utilizando-se suspensão 20% de massa celular de *Erwinia* sp D12 immobilizada com solução 1% de alginato de sódio Sigma® e obteve rendimento em torno de 50% de isomaltulose, utilizando-se soluções de sacarose entre 20 a 30% (p/v) a 35°C.

Kawaguti (2003), estudou a conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se células de *Erwinia* sp D12 immobilizadas com alginato de cálcio. Utilizando-se uma suspensão 40% de massa celular úmida de *Erwinia* sp 12 e solução 2% de alginato de sódio Synth® para imobilização das células foi obtido

74,18% de conversão de sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação a 30 °C.

A figura 20 ilustra o cromatograma dos padrões de glicose, frutose, sacarose e isomaltulose e a figura 21 ilustra o cromatograma dos açúcares obtidos pela conversão enzimática da sacarose, utilizando-se 20% de suspensão de células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas em solução 2% de alginato de sódio e solução de sacarose 35% (p/v), após 24 horas. Obteve-se 62,1% de isomaltulose, 31,5% de sacarose, 5% de outro açúcar, 1% de glicose e 0,4% de frutose.

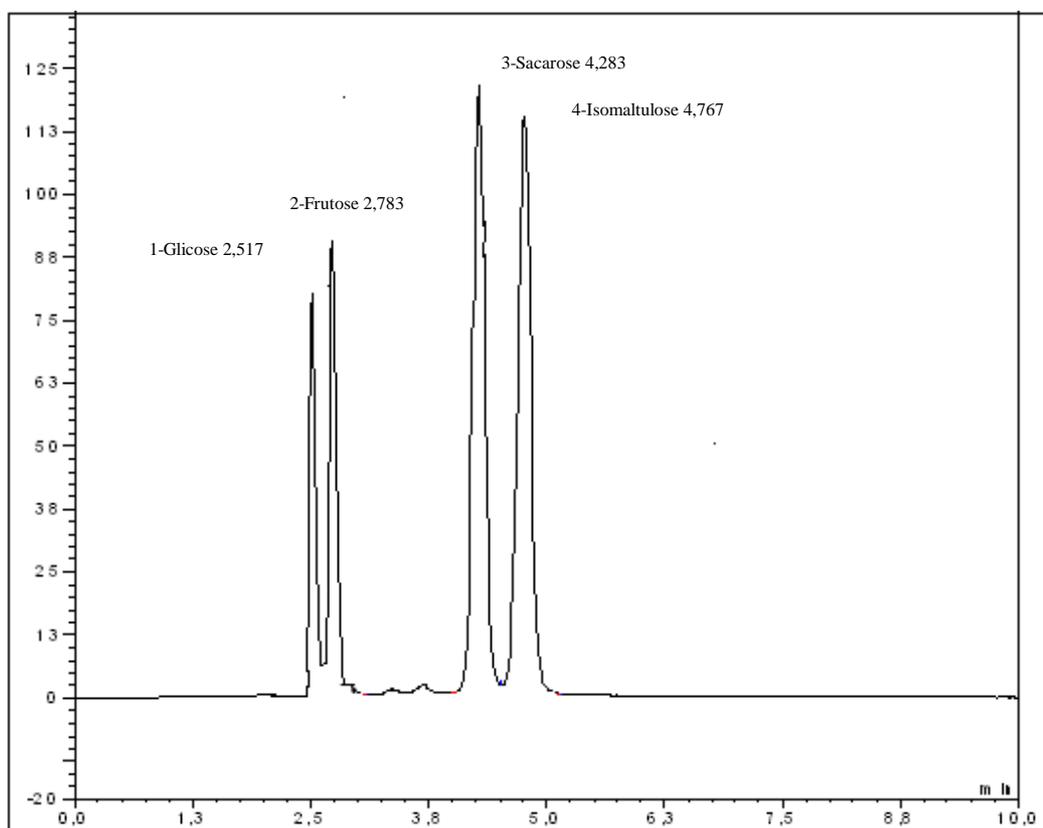


FIGURA 20: Cromatograma dos padrões de glicose, frutose, sacarose e isomaltulose.

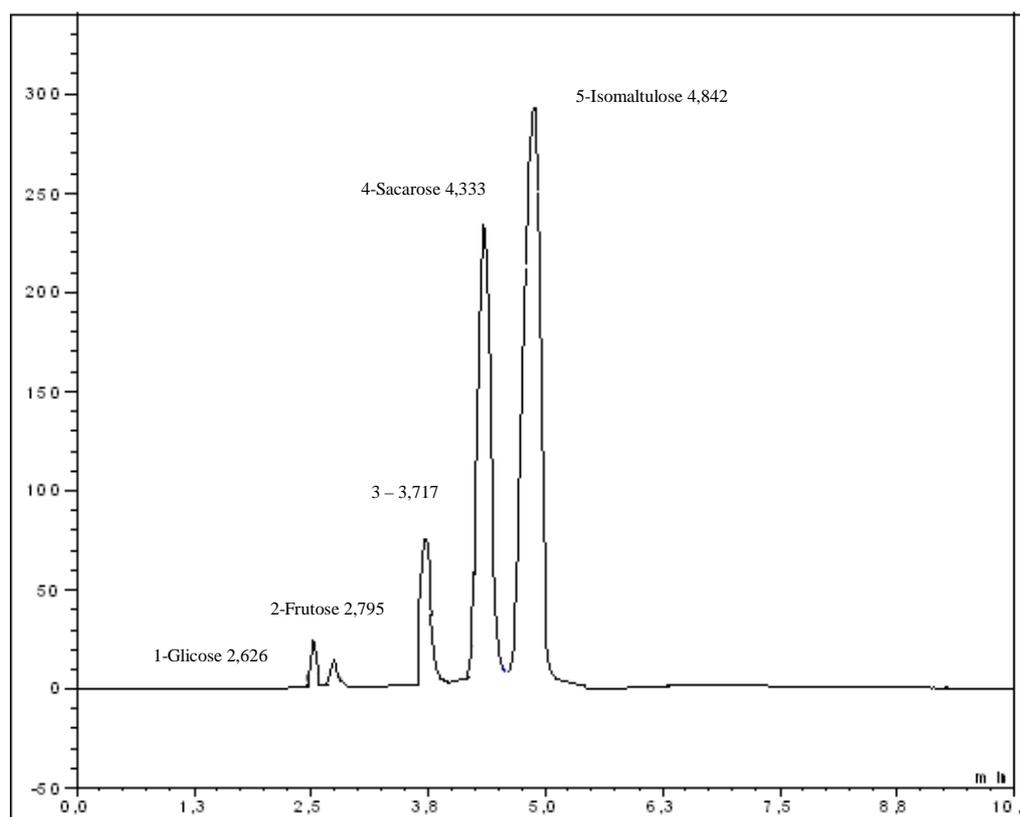


FIGURA 21: Cromatograma dos açúcares obtidos através da conversão enzimática da sacarose pelas células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com alginato de cálcio.

De acordo com a literatura as linhagens *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 (Sarkki et al., 1999), *Erwinia rhapsontici* NCPPB 1579 (Cheetham, 1984), *Serratia plymuthica* NCIB 8285 (Fujii et al., 1983), *Klebsiella planticola* CCRC 19112 (Huang et al., 1998), produzem principalmente isomaltulose (75-85%), trealulose (14-16%) e pequena quantidade de glicose (2-6%) e frutose (2-3%). A linhagem *Serratia plymuthica* NCIB 8285 também produz pequena quantidade de isomelezitose (8%).

5. CONCLUSÕES

Na otimização dos componentes do meio de cultivo para produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, em frascos agitados, foi obtido maior atividade enzimática (9,94 UA/mL) utilizando-se o meio composto de 80 g/L de melação de cana, 7 g/L de peptona bacteriológica da Biobrás[®] e 20 g/L de extrato de levedura Prodex Lac SD[®].

No estudo da relação entre o tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultivo, crescimento do microrganismo e produção de glicosiltransferase em diferentes temperaturas variando de 26°C a 35°C, através do cultivo da linhagem *Klebsiella* sp 18, em fermentador de 5 L, utilizando-se o meio de cultivo otimizado, a maior produção de glicosiltransferase ocorreu após 8 horas de fermentação na temperatura de 28°C, sendo obtido atividade enzimática de 21,78 UA/mL. Nas fermentações a 26°C e 30°C obteve-se atividade máxima da enzima após 8 horas de fermentação de 20,40 UA/mL e 21,53 UA/mL, respectivamente. Na fermentação a 35°C verificou-se baixa produção de glicosiltransferase pela linhagem *Klebsiella* sp 18, sendo obtido atividade máxima de 5,58 UA/mL após 6 horas de fermentação. Houve pequena alteração do pH durante as fermentações, sendo que após 2 horas de fermentação o pH era 5,7 e após 24 horas de fermentação o pH era 5,3.

Foram obtidos melhores resultados de conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se solução 2% de alginato de cálcio Synth[®] e suspensão 20% de massa celular (p/v) para a imobilização de células de *Klebsiella* sp 18 e como substrato a solução 35% de sacarose.

Na conversão de solução 35% de sacarose em bioreator, utilizando-se 20% de suspensão de células de *Klebsiella* sp 18 imobilizadas com solução 2% de alginato de sódio foi obtido 62,1% de isomaltulose, 31,5% de sacarose, 5% de outro açúcar, 1% de glicose e 0,4% de frutose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 5, p. 319-367, 1987.
2. BÖRNKE, 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, p. 2425-2430, 2001.
3. BÖRNKE, F.; HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. Potato tubers as bioreactors for palatinose production. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 119-124, 2002.
4. BUCKE, C.; CHEETHAM, P. S. J. **Production of isomaltulose**. UK. n.201.462, 26 out. 1982, 16 nov. 1982.
5. CHANG, H. N.; SEONG, G. H.; PARK, J. K.; SEO, J. H. Microencapsulation of recombinant *Saecharomyces cerevisaie* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 157-162, 1996.
6. CHEETHAN, P. S. J.; IMBER, C. E. e ISHERWOOD, J. The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. **Nature**, v. 299, p. 628-631, 1982.
7. 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.
8. CHEETHAM, P. S. J.; GARRETT, C. e CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 471-481, 1985.

9. CHEETHAM, P. S. J. Production of isomaltulose using immobilized cells. **Methods in Enzymology**, v. 136, p. 432-454, 1987.
10. COUGHLAN, M. P.; KIERSTAN, P. J. Preparation and applications of immobilized microorganisms: a survey of recent reports. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, p. 51-90, 1988.
11. CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. e ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal Clinical**, v. 73, p. 415S-420S, 2001.
12. CURTIN, L. V. Molasses: general considerations In: **Molasses in animal nutrition**. West Des Moines, Iowa: National Feed Ingredients Association. 1983.11p.
13. DERWAKOS, G.; WEBB, C. On the merits of viable cell immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 559-612, 1991.
14. EREGGER, P. Downstream processing of sucrose 6-glucosyltransferase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 36, p. 65-77, 1994.
15. FUJII, S.; KISHIIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation of *Serratia plymuthica*. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 30, p. 339-344, 1983.
16. GODSHALL, M. A. How carbohydrates influence food flavors. **Food Technology**, v. 51, p. 63-66, 1997.
17. HASHIMOTO, H.; YAMADA, K. e YOSHIMURA, J. Glucosylation of methyl β -D-arabinofuranoside with 6'-chloro-6'-deoxysucrose and immobilized *Protaminobacter rubrum*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 849-854, 1987

18. HEIKKILA, H.; SARKKI, M.; LINDROOS, M.; OJALA, P.; RAVANKO, V.; TYLLI, M. **Process of the production of isomaltulose and other products.** FI. n. 082555, 21 mai. 1998, 14 nov. 2000.
19. HUANG, J. H.; HSU, L. H. e SU, Y.-C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 22-27, 1998.
20. JONKER, D.; LINA, B. A. R. 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1383-1389, 2002.
21. KAKINUMA, H; YUASA, H. e HASHIMOTO, H. Glycosyltransfer mechanism of alfa-glucosyltransferase from *Protaminobacter rubrum*. **Carbohydrate Research**, v. 312, p.103-115, 1998.
22. 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.
23. KASHIMURA, J.; KIMURA, M. & ITOKAWA, Y. The effects of isomaltulose, isomalt and isomaltulose-based oligomers feeding and on mineral absorption and retention. **Biological Trace Element Research**, v. 54, p. 239-250, 1996 b.
24. KAWAGUTI, Y. H. **Produção de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12 e estudo da conversão de sacarose em isomaltulose.** Campinas, 2003. 145p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
25. KAWAI, K.; OKUDA, Y. & YAMASHITA, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. **Endocrinology Japan**, v. 32, p. 933-936, 1985.
26. KHAN, R. Chemical and enzymes transformations of sucrose. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 12-17, 1994.

27. LANTERO, O.J. **Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum***. US. n.82109404.2, 12 out. 1982, 4 mai.1983.
28. LICHTENTHALER, D. W. Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. **Carbohydrate Research**, v. 313, p. 69-89, 1998.
29. LINA, B. A. R.; SMITS-VAN PROOIJJE, A. E. e WAALKENS-BERENDSEN, D. H. Embryotoxicity/ teratogenicity study with isomaltulose (palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, 1997.
30. LINGSTRON, P.; LUNDGREN, F.; BITKHED, D.; TAKAZOE, I. & FROSTELL, G. Effects of frequent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. **European Journal of Oral Science**, v. 105, p.162-169, 1997.
31. LINKE, H. A. B. Sweeteners and dental health: the influence of sugar substitutes on oral microorganisms. **Developments in Sweeteners**, v. 3, p. 151-189, 1987.
32. LUND, B. M.; WYATT, G. M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Journal of General Microbiology**, v. 8, p. 330-336, 1973.
33. LUONG, B. M.; WYATT, G. M. Process and technoeconomics of ethanol production by immobilized cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p.207-216, 1984.
34. MAKI, Y.; OTHA, K.; TAKAZOE, I.; MATSUKUBO, Y.; TOPSOGLU, V.; FROSTELL, G. Acid production from isomaltulose, sucrose, sorbitol e xylitol in suspension human dental plaque. **Caries Research**, v. 17, p.335-339, 1983.
35. MALLETE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. **Methods in Microbiology**, v. 1, p. 522-566, 1969.
36. MCALLISTER, M.; KELLY, C. T.; DOYLE, E. e FOGARTY, W. M. The isomaltulose synthesing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 667-672, 1990.

37. MIYATA, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K.; EBASHI, T.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose. **Bioscience and Biotechnology and Biochemistry**, v. 54, p. 1680-1681, 1992.
38. MORAES, A. L. L. **Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio.** Campinas, 2002. 95p. Doutorado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
39. MOREIRA, R. F; MARIA, C. A. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, p. 516- 525, 2001.
40. NAGAY-MIYATA, Y.; TSUYUKI, K; SUGITANI, T. Isolation and characterization of a trehalulose producing strain of *Agrobacterium*. **Bioscience and Biotechnology and Biochemistry** , v. 57, p. 2049-2053, 1994.
41. NDINDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C. e REMON, J. P. Characterization and evaluation of isomalt performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, p. 113 -124, 1999.
42. NETO, B. D. B. SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos.** 3.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.
43. OGBONNA, J. C.; YOSHIFUMI; NAKAMURA,K. Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, p. 92-96, 1989.
44. OOSHIMA, T.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; OKAHASHI, N. e HAMADA, S. Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 43-49, 1983.
45. PARK, Y. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.

46. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T. e PUPIN, A. M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 547-551, 1992.
47. PARK, Y. K.; UEKANE, R. T. e SATO, H. H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 131-136, 1996.
48. PIKKS, A.; STEFAN, I.; ROBRISH, S. H., THOMPSON, J. Metabolism of sucrose and its five isomers by *Fusobacterium mortiferum*. **Microbiology**, v. 148, p. 843-852, 2002.
49. SARKKI, MARJA-LEENA; HEIKKILA, HEIKKI; VILJAVA, TAPIO. **Immobilization of microorganisms on weakly basic anion exchange substance for producing isomaltulose**, 16 mai. 1997, 17 ago. 1999.
50. SASAKI, N.; TOPITSOGLOU, V.; TAKAZOE, I. e FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E- 49. **Sweden Dental Journal**, v. 9, p. 149-155, 1985.
51. SCHIWECK, H.; STEINLE, G.; HABERL, L. **Processo para obtenção de isomaltitol**. BR. n.02665/73, 12 abr. 1973, 27 jun. 1974.
52. SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. **Method of producing an immobilized alpha-glicosiltransferase useful in the production of paaltinose from sucrose**. JP n. 8124779, 21 ago. 1981, 10 mar. 1982.
53. SIDDIQUI, I.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of the oligossaccharide from honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, p. 139-145, 1967.
54. SOMOGY-NELSON, M.; A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 1062-1063, 1960.

55. 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.
56. TAKAZOE, I.; OTHA, K.; SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; IWAKURA, T.; NAKAJIMA, Y. **Low-cariogenic sweeteners**. JP. n.8131880, 22 out. 1981, 12 mai. 1982.
57. TATE & LYLE, Christopher Bucke; Peter Samuel James Cheetam. **Production of isomaltulose**. UK n. P1 2063268A, 7 nov. 1979, 3 jun. 1981.
58. TOPITSOGLOU, V.; SASAKI, N. e FROSTELL, G. Effect of frequent rinses with isomaltulose (palatinose) solution on acid production in human dental plaque. **Caries Research**, v. 18, p. 47-51, 1984.
59. TSUYUKI, K.; SUGITANI, Y.; MIYATA, Y.; EBASHI, T. e NAKAJIMA, Y. Isolation and characterization of trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 483-490, 1992.
60. UEKANE, R. T. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. Campinas, 1993. 63 p. Mestrado. Ciência de Alimentos-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
61. VÉRONÈSE, T.; PERLOT, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 263-269, 1999.
62. XYROFIN OY, Heikki Heikkila; Marja-Leena Sarkki; Mirja Lindroos; Paivi Ojala; Vili Ravanko; Matti Tylli. **Process for the production of isomaltulose and others products**. US. n. PI 6.146.856, 16 mai. 1987, 11 jan. 2000.
63. ZHANG, D.; LI, N.; SWAMINATHAN, K., L.; ZHANG, L. H A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase. **FEBS Letters**, v. 534, p. 151-155, 2003.

64. ZHANG, D.; LI, N.; SHEE-MEI, L.; ZHANG, L. H.; SWAMINATHAN, K. Isomaltulose synthase (*Pall*) of *Klebsiella* sp strain LX3: crystal structure and implication of mechanism. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, manuscript 302616200, 2003 b.
65. ZHANG, D.; XIANZHEN, L.; ZHANG, L. H. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermo stability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2676-2682, 2002.
66. ZIESENITZ, C.S.; SIBERT, G. The metabolism and utilization of polyois and other bulk sweeteners compared with sugar. In: GRENBY, T. H. (Ed.). **Developments in sweeteners**. 1987. p. 109-149.
67. ZUMBÉ, A.; LEE, A.; STOREY, D. Polyois in confectionery: the sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionary. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. S31-S45, 2001.