

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

**CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA
GLICOSILTRANSFERASE DE *Erwinia* sp. D12 QUE CONVERTE
SACAROSE EM ISOMALTULOSE**

Fabiano Jares Contesini
Farmacêutico

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos. Área de concentração: Bioquímica de Alimentos.

CAMPINAS
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C767p Contesini, Fabiano Jares
Caracterização e imobilização da glicosiltransferase de
Erwinia sp. D12 que converte sacarose em isomaltulose /
Fabiano Jares Contesini. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Isomaltulose 2. Glicosiltransferase. 3. Imobilização. 4.
Purificação. 5. *Erwinia*. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

(lpm/fea)

Título em inglês: Characterization and immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia*
sp. D12 which converts sucrose into isomaltulose

Palavras-chave em inglês: Isomaltulose, Glucosyltransferase, Immobilization,
Purification, *Erwinia*.

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Área de Concentração: Bioquímica de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Luciana Ferracini dos Santos

Data de defesa: 19/02/2009

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida e aprovada em de de 2009,
pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato – Orientadora
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos
Centro Universitário Hermínio Ometto

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Haroldo Yukio Kawaguti
Universidade Estadual de Campinas

"As soon as you find the pattern, you break it. Otherwise it gets boring"

John Lennon

DEDICO

Aos meus pais Miguel e Nazaré pelo amor, paciência, conforto, compreensão e incentivo, ao longo destes anos. Ao meu irmão André pelo seu companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tornou tudo isso possível.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato por toda a ajuda, paciência, incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira, Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, Dr. Haroldo Yukio Kawaguti e Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro por todo o auxílio e sugestões.

Ao grande amigo Fabiano Augusto Sallowicz pelo seu grande auxílio, apoio e amizade.

Aos alunos de iniciação científica do Curso de Farmácia da Universidade São Francisco, em especial a Vania Castriani Fernandes da Silva, Rosemary Joana de Lima, Rafael Ferreira Maciel e Tatiana Mikie Nosso.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

Aos amigos do Laboratório de Bioaromas, especialmente Dão (Júnio) e Fábio.

Aos camaradas de Bragança Paulista Jarra, Guema, Sapão, Mineiro e Monica.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Bia, Priscila e Val.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À Universidade São Francisco e seus funcionários.

À empresa Cp Kelco pelo fornecimento da pectina de baixo teor de metoxilas.

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	Isomaltulose	4
2.1.1	Aspectos gerais	4
2.1.2	Metabolismo da isomaltulose	5
2.1.3	Toxicidade e cariogenicidade da isomaltulose	7
2.1.4	Aplicações da isomaltulose	8
2.2	Glicosiltransferase	10
2.3	Imobilização de enzimas ou células	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Microrganismo produtor de glicosiltransferase	18
3.2	Produção de glicosiltransferase	18
3.3	Determinação da atividade de glicosiltransferase	19
3.4	Purificação da glicosiltransferase	20
3.4.1	Cromatografia de troca iônica	20
3.4.2	Determinação da massa molecular da glicosiltransferase produzida pela <i>Erwinia</i> sp. D12	20
3.4.3	Determinação de proteínas	21
3.5	Caracterização da glicosiltransferase presente no extrato enzimático bruto e nos diferentes graus de purificação	21
3.5.1	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática	21
3.5.2	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	21
3.5.3	Efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática	22
3.6	Aplicação da glicosiltransferase na conversão da sacarose em isomaltulose	23
3.7	Imobilização da glicosiltransferase bruta	23
3.7.1	Imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	23

3.7.1.1	Otimização das condições do processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite.....	23
3.7.1.2	Otimização das condições de conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	24
3.7.1.3	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	25
3.7.1.3.1	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada	25
3.7.1.3.2	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leite empacotado.	25
3.7.2	Imobilização da glicosiltransferase bruta em gel de pectina BTM....	26
3.7.2.1	Caracterização físico-química das microcápsulas contendo glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM	27
3.7.2.2	Liofilização das microcápsulas.....	27
3.7.2.3	Morfologia e microestrutura das microcápsulas	28
3.7.2.4	Determinação da atividade da glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM.....	28
3.7.2.5	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM	29
3.7.2.5.1	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em pectina BTM contendo gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada.....	29
3.7.2.5.2	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM contendo gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leite empacotado	29
3.8	Análise dos carboidratos formados.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Purificação da glicosiltransferase.....	31
4.2	Determinação da massa molecular da glicosiltransferase produzida pela <i>Erwinia</i> sp. D12.....	33

4.3	Caracterização da glicosiltransferase bruta e das frações purificadas....	35
4.3.1	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática	35
4.3.2	Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	36
4.3.3	Efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática	44
4.4	Aplicação da glicosiltransferase na conversão da sacarose em isomaltulose.....	52
4.5	Imobilização da glicosiltransferase bruta	55
4.5.1	Imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	55
4.5.1.1	Otimização das condições do processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite.....	55
4.5.1.2	Otimização das condições de conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	67
4.5.1.3	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	72
4.5.1.3.1	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada	72
4.5.1.3.2	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leito empacotado.	74
4.5.2	Imobilização da glicosiltransferase bruta em gel de pectina BTM....	75
4.5.2.1	Caracterização físico-química das microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM com e sem a adição de gordura	75
4.5.2.2	Análises microscópicas	76
4.5.2.3	Retenção da atividade enzimática de glicosiltransferase nas microcápsulas de gel de pectina BTM.....	81
4.5.2.4	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura.....	82
4.5.2.4.1	Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada.....	82

	4.5.2.4.2 Aplicação da glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leite empacotado	84
5	CONCLUSÕES	86
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Purificação de glicosiltransferase de <i>Erwinia</i> sp D12	31
Tabela 2. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17	37
Tabela 3. Delineamento composto central rotacional 2^2 codificado para o estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17.....	38
Tabela 4. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta.....	39
Tabela 5. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta	40
Tabela 6. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 2	40
Tabela 7. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 2	41
Tabela 8. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 17	41
Tabela 9. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 17	42
Tabela 10. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17 por 1 hora de armazenamento.....	45
Tabela 11. Delineamento composto central rotacional 2^2 codificado para o estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17 por 1 hora de armazenamento	46

Tabela 12. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta	47
Tabela 13. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta	47
Tabela 14. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº2	48
Tabela 15. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº2.....	48
Tabela 16. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº17	49
Tabela 17. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº17.....	49
Tabela 18. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta em diferentes tempos de reação.....	53
Tabela 19. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase purificada da fração nº2 em diferentes tempos de reação	54
Tabela 20. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase purificada da fração nº17 em diferentes tempos de reação	54
Tabela 21. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2 ³ para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	56
Tabela 22. Delineamento composto central rotacional 2 ³ codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; primeira batelada .	57
Tabela 23. Delineamento composto central rotacional 2 ³ codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; segunda batelada	57

Tabela 24. Delineamento composto central rotacional 2^3 codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; terceira batelada ..	59
Tabela 25. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH, quantidade de enzima, glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada	60
Tabela 26. Análise de variância no estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada	61
Tabela 27. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e da quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite tratadas com 0,1% de glutaraldeído.....	64
Tabela 28. Delineamento composto central rotacional 2^2 codificado para o estudo da influência do pH e da quantidade da enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	64
Tabela 29. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	65
Tabela 30. Análise de variância no estudo da influência do pH e quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	66
Tabela 31. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^3 para o estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite.....	68
Tabela 32. Delineamento composto central rotacional 2^3 codificado para o estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	69

Tabela 33. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite	70
Tabela 34. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite.....	71
Tabela 35. Caracterização físico-química das microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM com e sem a adição de gordura..	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase microbiana.....	3
Figura 2. Eluição das proteínas e atividade de glicosiltransferase após cromatografia em coluna de SP-Sepharose Fast Flow	32
Figura 3. Eletroforese desnaturante de poliácridamida (SDS-PAGE) das glicosiltransferases das frações nº2 e 17	34
Figura 4. Relação entre R _f e Log da massa molecular das proteínas em gel de SDS – poliácridamida para a determinação da massa molecular da glicosiltransferase purificada	34
Figura 5. Efeito da concentração do substrato sacarose na atividade enzimática de glicosiltransferase nos diferentes graus de purificação	36
Figura 6. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de glicosiltransferase em função do pH e temperatura de reação	43
Figura 7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade relativa de glicosiltransferase em função do pH e temperatura na estabilidade da glicosiltransferase.....	51
Figura 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído, no processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada	62
Figura 9. Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH e quantidade de enzima no processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite	66
Figura 10. Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH e da temperatura de reação utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite e concentração de sacarose de 30%.....	72

Figura 11. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite com e sem tratamento com glutaraldeído, em processo de batelada	73
Figura 12. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite com e sem tratamento com glutaraldeído, em coluna de leito empacotado	75
Figura 13. Distribuição do tamanho das microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase sem adição de 2% de gordura	77
Figura 14. Distribuição do tamanho das microcápsulas de gel de pectina BTM contendo a glicosiltransferase com adição de 2% de gordura	78
Figura 15. Microcápsulas de gel de pectina BTM recém preparadas, contendo glicosiltransferase sem adição de gordura. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)	78
Figura 16. Microcápsulas de gel de pectina BTM recém preparadas, contendo glicosiltransferase com adição de gordura. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)	79
Figura 17. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas sem adição de gordura, após serem utilizadas em seis bateladas de 30 minutos de conversão de sacarose em isomaltulose. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)	79
Figura 18. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas com adição de gordura, após serem utilizadas em seis bateladas de 30 minutos de conversão de sacarose em isomaltulose. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)	80
Figura 19. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas sem adição de gordura e liofilizadas. Microscopia eletrônica de varredura (a - aumento de 1400 vezes; b – aumento de 1200 vezes)	80
Figura 20. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas com adição de gordura e liofilizadas. Microscopia eletrônica	

	de varredura (a - aumento de 1200 vezes; b – aumento de 1100 vezes)	81
Figura 21.	Atividade enzimática relativa das diferentes microcápsulas de glicosiltransferase immobilizadas em gel de pectina BTM após seis bateladas de 30 minutos	82
Figura 22.	Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta immobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura em processo de batelada	84
Figura 23.	Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta immobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, em coluna de leite empacotado	85

RESUMO

A isomaltulose é um dissacarídeo redutor, isômero da sacarose, com propriedades interessantes para a indústria de alimentos. Este açúcar apresenta propriedades similares às da sacarose, entretanto, apresenta baixo potencial cariogênico e baixo índice glicêmico. A isomaltulose é produzida industrialmente através da conversão enzimática da sacarose pela enzima glicosiltransferase produzida por certas linhagens de bactérias, como *Protoaminobacter rubrum* e *Erwinia rhapontici*. Este trabalho teve por objetivo purificar e caracterizar a glicosiltransferase produzida pela *Erwinia* sp. D12 e imobilizar a glicosiltransferase bruta em Celite e pectina de baixo teor de metoxilas (BTM). A glicosiltransferase foi purificada por cromatografia em coluna de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow, obtendo-se duas frações com atividade de glicosiltransferase. A enzima da fração nº 17 foi purificada cerca de 17,9 vezes, e a massa molecular foi estimada em 65 kDa, por SDS-PAGE. A glicosiltransferase bruta e as frações purificadas apresentaram atividade ótima em pH de 6,0 a 6,5 e em temperatura de 30 a 35°C e estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 7,0 e em temperaturas inferiores a 30°C, sendo que as frações purificadas apresentaram menor estabilidade. As condições ótimas de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite foram pH 4,0 para adsorção da enzima no suporte, e quantidade de enzima de 1700 U. A glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite, em processo de batelada e em coluna de leito empacotado, converteu cerca de 50% de sacarose em isomaltulose, porém a conversão diminuiu com o tempo. O tratamento da glicosiltransferase imobilizada em Celite com 0,1% de glutaraldeído não resultou em aumento da retenção e estabilidade da enzima. A glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura manteve maior atividade de glicosiltransferase que as preparações de enzima imobilizada sem gordura e liofilizadas. Quando essa preparação foi aplicada em processo de batelada foi observada conversão inicial em torno de 30% com queda gradativa nas posteriores bateladas. Em colunas de leito empacotado foi observada

conversão de sacarose em isomaltulose máxima de 10,5% em 2 horas, sendo que após 60 horas foi igual a 3%.

SUMMARY

Isomaltulose is a reducing disaccharide and an isomer of sucrose. Because of its properties it is interesting for application in the food industry. This sugar shows similar properties to sucrose, but it has low cariogenic potential and low glycemic index. Industrially, isomaltulose is produced by conversion of sucrose using glucosyltransferase. This enzyme is produced by few bacterial strains such as *Protoaminobacter rubrum* and *Erwinia rhapontici*. The aims of this research were the purification and characterization of glucosyltransferase produced by *Erwinia* sp. D12 and the immobilization of the crude enzyme in Celite and low-metoxyl pectin. The glucosyltransferase was purified using cationic exchange column of SP-Sepharose Fast Flow and it was obtained two fractions with glucosyltransferase activity. The enzyme found in 17th fraction was purified 17.9-fold, and showed a molecular mass of 65 kDa, by SDS-PAGE. The crude glucosyltransferase and the purified fractions showed optimum activity in pH of 6.0 – 6.5 and 30 – 35°C and stability in pH 5.0 to 7.0 and under 30°C, and the purified preparation was less stable than the crude enzyme. The optimum condition of the immobilization of crude glucosyltransferase was using pH 4.0 for the adsorption of the enzyme into the support, and amount of enzyme of 1700 U. The glucosyltransferase immobilized on Celite was applied to the conversion of sucrose into isomaltulose in a batch system and packed-bed reactor. A conversion rate of 50% was observed, but this decreased over a period of hours. The treatment of the immobilized glucosyltransferase on Celite, with 0.1% glutaraldehyde did not increase the stability of the enzyme. The immobilization of crude glucosyltransferase in low-metoxyl pectin with a fat addition, presented a higher activity when compared to microcapsules without fat or freeze dried. When this preparation was applied to the conversion of sucrose into isomaltulose, in a batch system, it was observed an initial conversion rate of 30%. However this value decreased in further batches. In the packed-bed reactors, the highest conversion value of sucrose to isomaltulose was 10.5% in 2 hours, but after 60 hours the conversion was 3%.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a sacarose é o açúcar mais utilizado na produção de alimentos, devido à sua alta disponibilidade e suas propriedades sensoriais e físico-químicas. Entretanto, existe um grande esforço em encontrar açúcares alternativos à sacarose para a indústria de alimentos, devido às propriedades indesejáveis desse açúcar, podendo destacar seu alto poder cariogênico e alto índice glicêmico.

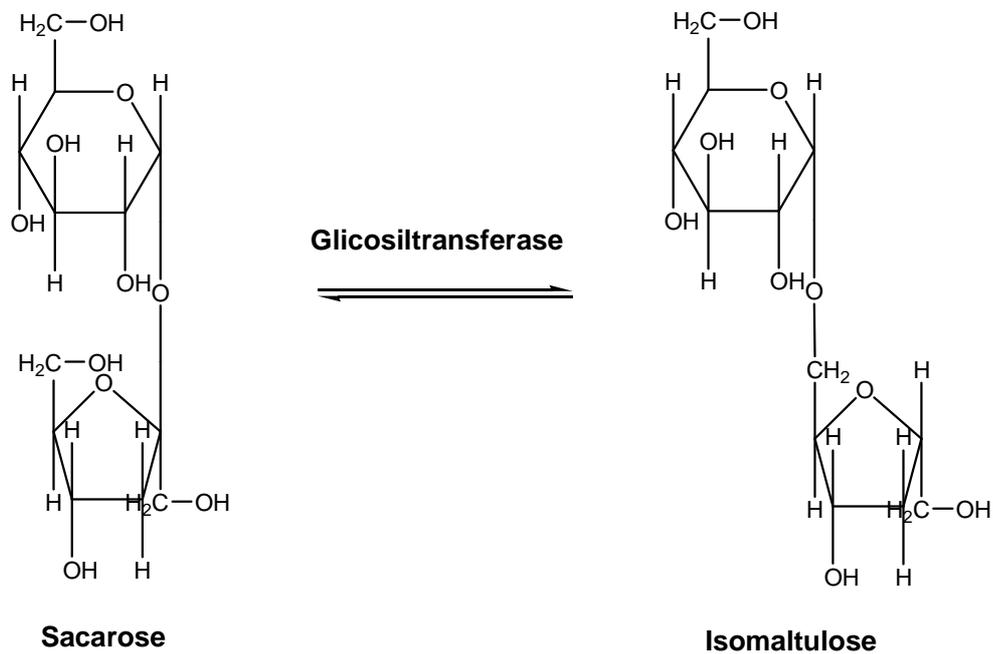
Dentre os possíveis açúcares estudados, a isomaltulose (6-O- α -D-glicopiranosil-D-frutofuranose) também chamada de Palatinose[®] tem sido considerada bastante interessante. Este é um dissacarídeo redutor, isômero da sacarose, que não apresenta potencial cariogênico, não é tóxico, e sua ingestão resulta em baixos índices glicêmicos, devido a sua lenta absorção.

A isomaltulose é naturalmente encontrada em baixas concentrações no caldo de cana e mel e é obtida industrialmente pela conversão enzimática da sacarose através de uma reação de transglicosilação catalisada pela enzima glicosiltransferase (Figura 1) também chamada de sacarose isomerase ou isomaltulose sintase. Esta enzima é encontrada em algumas espécies de bactérias como *Protoaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica*, *Klebsiella planticola* e *Erwinia* sp. D12.

Podem-se obter a partir da isomaltulose diversos outros produtos de interesse industrial, como surfactantes e detergentes biodegradáveis. Porém o produto que merece maior destaque devido a sua grande importância industrial é um açúcar-álcool chamado de isomalte que é obtido a partir da hidrogenação química da isomaltulose. Este poliol é constituído por uma mistura equimolar de [6-O—(α -D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [1-O—(α -D-glicopiranosil)-D-manitol]. Também é conhecido como Palatinit[®] e Isomalt[®], sendo interessante como substituto da sacarose por não ser cariogênico, não ser tóxico, não ser calórico e poder ser utilizado por diabéticos.

Como já descrito anteriormente, a isomaltulose é obtida a partir da sacarose através de uma reação enzimática, logo, um eficiente processo de imobilização do biocatalisador deve ser estudado. Técnicas de imobilização de enzimas ou de células são muito utilizadas nas mais diversas áreas industriais, e tem como finalidade reter o biocatalisador (enzimas ou células) em um determinado suporte insolúvel permitindo sua reutilização, aumento da estabilidade, além de outras vantagens. Dentre os processos mais citados na literatura tem-se o confinamento de enzimas ou células através da encapsulação por gelificação iônica, utilizando hidrogéis como pectina e alginato. Este processo é interessante, pois apresenta baixo custo, não apresenta toxicidade, e a gelificação pode ocorrer à temperatura ambiente ou inferiores, o que contribui para a manutenção da atividade do biocatalisador. Outra técnica muito relatada é a imobilização de enzimas por adsorção superficial em suportes insolúveis como Celite, montmorilonita k 10 e carvão ativo ou ainda a utilização de agentes reticulantes como o glutaraldeído que visam uma maior retenção do biocatalisador no suporte.

Este trabalho teve por objetivo purificar e caracterizar a glicosiltransferase produzida por *Erwinia* sp. D12, bem como imobilizar a glicosiltransferase bruta em Celite e em gel de pectina de baixo teor de metoxilas para a aplicação na conversão da sacarose em isomaltulose.



α -D-glicopiranosil-1,2-D-frutofuranose

α -D-glicopiranosil-D-1,6- D-frutofuranose

Figura 1. Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase microbiana

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Isomaltulose

2.1.1 Aspectos gerais

Existe um crescente interesse na descoberta de substitutos da sacarose (α -D-glicopiranosil-1,2-D-frutofuranose) devido aos efeitos indesejáveis desse açúcar na saúde humana, como a contribuição ao ganho de peso, seu alto poder cariogênico e alto índice glicêmico (BAER, 1989; MATSUKUBO e TAKAZOE 2006). Dentre os açúcares alternativos à sacarose, a isomaltulose (α -D-glicopiranosil-1,6-D-frutofuranose) também conhecida como Palatinose[®] tem se mostrado bastante interessante. Esse açúcar é um isômero estrutural da sacarose, sendo considerado não cariogênico, encontrado em pequenas quantidades em alimentos ricos em sacarose como cana-de-açúcar, mel e algumas frutas (STODOLA et al., 1956).

A isomaltulose possui cerca de 50% do poder adoçante e propriedades sensoriais e físico-químicas muito similares às da sacarose, porém apresenta diversas vantagens. Sua solubilidade é cerca de metade da sacarose o que facilita sua separação na etapa de cristalização (TAKAZOE, 1989).

Este substituto da sacarose, além de não ser cariogênico, apresenta baixo índice glicêmico, o que é interessante para consumidores diabéticos; promove seletivamente o crescimento de bifidobactérias benéficas na microflora do intestino humano; apresenta maior estabilidade do que a sacarose em alguns alimentos e bebidas (devido à maior estabilidade em presença de meios ácidos e estabilidade ao metabolismo de diversos microrganismos); é menos higroscópico do que a sacarose e pode facilmente ser convertido a uma mistura de açúcar-álcool que é utilizado como adoçante dietético e não cariogênico em alimentos (TAKAZOE 1989).

A isomaltulose tem sido aprovada para consumo humano, sendo então usada como substituto da sacarose em diversos alimentos, bebidas e

medicamentos (LINA et al., 2002). Devido ao grupo carbonila acessível, a isomaltulose tem chamado a atenção para a manufatura de bioprodutos como polímeros e surfactantes com potenciais vantagens em relação aos produtos obtidos do petróleo (CARTARIUS et al., 2001).

A isomaltulose é atualmente produzida em reatores em coluna de escala industrial contendo células bacterianas imobilizadas. A conversão incompleta do substrato, a lenta produção e certos subprodutos são os principais fatores limitantes da eficiência comercial (FUJII et al., 1983; SCHIWECK et al., 1991; VÉRONÈSE e PERLOT, 1999).

2.1.2 Metabolismo da isomaltulose

Quanto à metabolização da isomaltulose, um estudo do perfil de absorção do açúcar em comparação com a sacarose indicou que as velocidades de ascensão dos níveis de glicose, frutose e insulina depois da ingestão da isomaltulose são menores quando comparadas a ingestão da sacarose, devido à absorção mais lenta da isomaltulose no trato gastrointestinal (MACDONALD e DANIEL, 1983).

Sabe-se que o consumo excessivo de carboidratos e gordura está relacionado com o desenvolvimento da obesidade, porém o mecanismo de processos metabólicos relacionados com o consumo de diferentes carboidratos e gorduras não está totalmente esclarecido. Sato et al. (2007) relataram que o consumo de isomaltulose junto ao ácido oléico é mais vantajoso em comparação ao consumo da sacarose com os ácidos oléico e/ou linolênico, pois resulta em uma diminuição na massa de gordura visceral, diminuição das células adipócitas, da hiperglicemia e da hiperlipidemia. Com isso os autores concluíram que a combinação da isomaltulose e ácido oléico correspondem a um promissor campo de estudo na prevenção e tratamento da obesidade e suas complicações.

A isomaltulose é digerida mais lentamente do que a sacarose e conseqüentemente resultando em uma menor viabilidade para a absorção. Estudo realizado por Achten et al. (2007) mostrou que a oxidação da isomaltulose ingerida oralmente resultou em menor concentração de glicose e insulina no plasma. Com isso foram observadas menores taxas de oxidação de carboidratos endógenos e maior oxidação de gordura por humanos do sexo masculino praticantes de atividades físicas, quando comparado com a oxidação da sacarose.

Um estudo realizado por Kashimura e Nagai (2007) indicou que os níveis de glicose no sangue eram menores quando se ingere glicose ou sacarose simultaneamente com a isomaltulose, do que quando se ingere somente um desses dois açúcares. Nesse estudo foi avaliado se a isomaltulose suprimia a absorção da glicose no intestino de ratos. Foram adicionadas na ração, concentrações de 0 a 5 mM de isomaltulose e 20 mM de glicose e após a alimentação dos ratos com a ração foi avaliada a absorção da glicose. Observou-se menor absorção de glicose à medida que se aumentava a concentração de isomaltulose. Um possível mecanismo que justifica esse processo é a inibição das enzimas que degradam carboidratos como a sacarose, maltose e amido (KASHIMURA et al., 2005).

Arai et al. (2007) estudaram o efeito da ingestão da dieta líquida a base de isomaltulose no índice glicêmico. Sabe-se que a hiperglicemia pós-prandial induz a hiperinsulinemia prolongada, o que é um fator de risco para pacientes diabéticos do tipo dois. Assim, alimentos com baixo índice glicêmico resultam em um aumento não tão rápido nos níveis de glicose e insulina plasmáticos pós-prandial. Neste estudo em que sete pacientes do sexo masculino saudáveis foram alimentados com uma dieta líquida à base de isomaltulose, o nível de glicose, insulina e ácidos graxos livres foram reduzidos em relação ao grupo de pacientes que não ingeriu alimento a base de isomaltulose.

2.1.3 Toxicidade e cariogenicidade da isomaltulose

Lina et al. (1997) avaliaram a toxicidade da isomaltulose alimentando ratos fêmeas gestantes com ração contendo 10% desse dissacarídeo e observaram que nas condições estabelecidas não houve embriotoxicidade ou teratogenicidade.

Um estudo realizado para avaliar o potencial de toxicidade oral subcrônica da isomaltulose relata a administração do açúcar em concentrações de 2,5 a 10% por 13 semanas em ratos, indicando que após observações clínicas diárias, o peso corpóreo, digestão, consumo de alimentos e água não foram afetados em nenhum momento do estudo. Análises oftalmológicas, hematológicas, histopatológicas, de urina, do peso dos órgãos, observações neurocomportamentais, atividade motora e de imunotoxicidade indicaram que a ingestão da isomaltulose não resulta em nenhuma anormalidade (JONKER, 2002).

Um estudo subcrônico avaliou o balanço mineral, indicando que a isomaltulose não induz alterações aparentes, peso corpóreo e peso de órgãos, quando alimentados com 30% do carboidrato por 8 semanas ou até 15% por 13 semanas em 15 ratos Wistars. Os componentes minerais de vários tecidos também não sofreram nenhuma influência após a ingestão de isomaltulose (KASHIMURA et al., 1990).

A isomaltulose proporciona a vantagem de apresentar um menor potencial cariogênico em relação à sacarose. Sasaki et al. (1985) realizaram estudo em que ratos Wistars foram alimentados com 56% de isomaltulose, outro grupo com 56% de sacarose e outro grupo com uma mistura de isomaltulose e sacarose (17,5% e 38,5%, respectivamente). Todos os animais receberam por via oral uma suspensão da linhagem de *Streptococcus mutans* resistente a estreptomicina e após a dieta com esses carboidratos foi observado que os animais que se alimentaram apenas com sacarose por 8 e 14 semanas apresentaram lesões graves nos dentes devido ao desenvolvimento de cáries, enquanto os que se alimentavam apenas com isomaltulose apresentaram lesões insignificantes nos

dentes. Os animais que se alimentaram de uma mistura de sacarose e isomaltulose apresentaram uma diminuição do desenvolvimento de cárie, indicando assim o baixo potencial cariogênico da isomaltulose. Estes autores observaram ainda que os animais alimentados somente com isomaltulose apresentaram baixa porcentagem de *S. mutans* nos dentes em comparação com os animais alimentados com sacarose ou com a mistura desses dois carboidratos.

2.1.4 Aplicações da isomaltulose

Devido às vantagens da isomaltulose sobre a sacarose esse açúcar tem sido utilizado em alimentos e bebidas consideradas não cariogênicas e de baixo índice glicêmico, sendo assim já comercializado em países como Japão desde 1985.

A isomaltulose também tem sido empregada em alimentos para nutrição parenteral em pacientes com câncer de esôfago complicado por diabetes melitus, que não podem se alimentar por via oral e apresentam dificuldade da metabolização da glicose (FUJIWARA et al., 2007).

A isomaltulose pode ser empregada na maioria dos alimentos industrializados como substituinte da sacarose sem alteração nos processos de manufatura. Logo, esse açúcar é aplicado na confecção de produtos de panificação, caramelos, frutas enlatadas, gomas de mascar, produtos à base de chocolate, confeitos, pudins, recheios e coberturas, bebidas para esportistas e pasta de dente (IRWIN e STRÄTER, 1990)

Um produto de grande importância mundial que é obtido a partir da isomaltulose é o isomalte. Também conhecido como Isomalt[®], Palatinit[®], palatinitol ou isomaltitol é uma mistura equimolar de [6-O—(α-D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [1-O—(α-D-glicopiranosil)-D-manitol] obtido por hidrogenação da isomaltulose (GOLDSCHER, 1997). Apresenta poder adoçante de cerca de 45 a 65% da

sacarose. Em diversas aplicações o isomalte é usado em conjunto com outros adoçantes.

Com relação as suas propriedades, o isomalte é inodoro, branco, doce, cristalino, não-higroscópico. Assim, na maioria de suas propriedades físico-químicas o isomalte é muito similar à sacarose, porém é menos calórico e higroscópico e mais estável que a sacarose o que permite sua variada aplicação na indústria alimentícia. Esse poliálcool não é redutor e, ao contrário da sacarose, é extremamente estável a hidrólise enzimática, além de não deixar sabor residual. Seu ponto de fusão é de cerca de 145-150°C e não sofre reação de Maillard (STRÄTER, 1986).

O isomalte é parcialmente hidrolisado e absorvido no intestino grosso, apresentando assim valor calórico menor que a metade da sacarose, sendo então consumido por diabéticos sem qualquer risco de altos níveis de glicemia. Não apresenta potencial cariogênico por não ser um substrato para a formação de placas ou formação de ácidos por certas bactérias bucais. Por apresentar ligação 1,6 o isomalte é resistente à hidrólise ácida por enzimas digestivas humanas, sendo também estável em meio alcalino (IRWIN, 1990).

Este açúcar-álcool é utilizado na maioria das aplicações da sacarose, principalmente em produtos denominados sem açúcar, light, não cariogênico e permitido para diabéticos. Pode ser usado em balas, caramelos, chocolates, entre outras aplicações.

O isomalte apresenta uma fraca tendência em se ligar com o cálcio, devido a presença de nove grupos hidroxílicos dentro de uma molécula (IMFELD, 1983). Assim, o isomalte pode influenciar a mineralização dos dentes.

Os polióis, sendo mono e dissacarídeos alcoóis, apresentam grande interesse para serem usados como adoçantes em formulações farmacêuticas, pois combinam o poder adoçante com baixo valor calórico, além do reduzido poder cariogênico destes compostos (NDINDAYINO et al., 1999).

2.2 Glicosiltransferase

Glicosiltransferase, também chamada de isomaltulose sintase e sacarose isomerase (EC 5.4.99.11) é uma enzima que catalisa a conversão da sacarose em isomaltulose (α -D-glicopiranosil-1,6-D-frutofuranose), trealulose (α -D-glicopiranosil-1,1-D-frutofuranose) e traços de glicose e frutose como subprodutos (HUANG et al., 1998). É uma enzima localizada no espaço periplasmático de algumas linhagens de bactérias como *Klebsiella planticola* (HUANG et al., 1998), *Serratia plymuthica* (MCALLISTER et al., 1990), *Erwinia rhapontici* (CHEETHAM et al., 1985) e *Erwinia* sp. D12 (KAWAGUTI et al., 2006).

A reação enzimática catalisada pela glicosiltransferase ocorre pela transglicosilação da sacarose, sendo que o mecanismo que controla a isomerização da sacarose não foi completamente caracterizado. Todavia, podem ser encontrados alguns estudos que fornecem informações quanto a esse mecanismo, como o trabalho realizado por Véronèse e Perlot (1999) que estudaram o mecanismo de ação da isomaltulose sintase de *Serratia plymuthica*. Neste trabalho, inicialmente a enzima foi extraída das células por ultrasonicação, concentrada por ultrafiltração e posteriormente purificada por cromatografia de filtração em gel usando Sephacryl S-200 HR, cromatografia de troca iônica utilizando o trocador aniônico Q Sepharose, cromatografia de afinidade utilizando hidroxiapatita e ainda cromatografia de interação hidrofóbica utilizando Phenyl-Sepharose como fase estacionária. A enzima apresentou ponto isoelétrico em pH igual a 9,0 e massa molecular de 65 kDa. Foi relatado que a glicose é um inibidor competitivo, pois pode se ligar no sítio ativo da enzima e dificultar a ligação da sacarose, sendo que outros açúcares também podem atuar como inibidores competitivos.

McAllister et al. (1990) purificaram a glicosiltransferase de *Serratia plymuthica* ATCC 1592, cerca de 25 vezes, e verificaram que a enzima apresentava pI em pH 9,0 e massa molecular igual a 79,5 kDa. A enzima

purificada apresentou atividade ótima a 30°C e pH 6,0 e valor de Km igual a 65,3 mM de sacarose.

Park et al. (1996) estudaram a purificação da glicosiltransferase produzida por *Klebsiella* sp. e suas propriedades bioquímicas. A enzima foi purificada cerca de 12,1 vezes por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e CM-Celulose. A enzima purificada apresentou massa molecular de 74 kDa e valores de constante de Michaelis-Menten (Km) e velocidade máxima de reação (V_{máx}) iguais a 120 mM de sacarose e 110 µg de isomaltulose formada por min/mL, respectivamente. Os valores de pH e temperatura ótima foram respectivamente de 6,0 e 6,5 e 35°C, e a enzima foi completamente inativada em presença de íons Ag⁺ e Hg²⁺.

Huang et al. (1998) estudaram a produção de isomaltulose sintase de *Klebsiella planticola* e verificaram que as melhores fontes de carbono, sais inorgânicos e fonte de nitrogênio para o cultivo do microrganismo foram sacarose, NaCl e bacto-triptona, respectivamente.

Zhang et al. (2002) estudaram a purificação de uma isomaltulose sintase da linhagem de *Klebsiella* sp. LX3 por cromatografia de afinidade resultando em uma enzima ainda impura, apresentando fração de 67 kDa e diversas frações de menor massa molecular. Essas últimas frações foram então eliminadas após etapa de purificação em coluna semi-preparativa de filtração em gel Protein Pack SW. Os autores verificaram que utilizando-se a isomaltulose sintase clonada de *Klebsiella* sp. LX3 e sacarose como substrato, o pH e a temperatura afetaram a proporção dos monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeos (isomaltulose e trealulose) formados. O aumento da temperatura promoveu a liberação de monossacarídeos, diminuição da formação de trealulose, todavia a proporção de isomaltulose não foi influenciada significativamente.

Dentre as técnicas utilizadas para aumentar a produção de isomaltulose pelas bactérias produtoras de glicosiltransferase se encontram as técnicas genéticas como a mutagênese do microrganismo relatada no trabalho realizado por Ahn et al. (2003). Esse estudo relata a obtenção de uma linhagem mutante de

Erwinia rhapontici através de um processo de *screening* de alta eficiência, resultando em uma linhagem que apresentou conversão de sacarose em isomaltulose de 90% e produtividade de $194\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, considerando que a conversão máxima de sacarose em isomaltulose da *Erwinia rhapontici* não ultrapassa 80% (YUN et al., 1992). Posteriormente os autores imobilizaram o microrganismo em alginato de cálcio e aplicaram o biocatalisador em uma coluna de leite empacotado resultando em conversão de sacarose em isomaltulose de 89% e produtividade de $144\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ a 30°C .

Li et al. (2004) isolaram do solo uma bactéria produtora de glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose que não produz glicose como subproduto. Após testes genéticos foi observado que o microrganismo pertencia ao gênero *Klebsiella*, porém sua espécie ainda não tinha sido catalogada sendo então classificada como uma nova espécie denominada *Klebsiella singaporensis* sp. nov.

Wu e Birch (2004) estudaram um microrganismo produtor de isomaltulose pertencente à espécie *Pantoea dispersa* que apresentou velocidade de conversão da sacarose em isomaltulose mais rápida do que os microrganismos de referência *Protaminobacter rubrum* CBS574.77 e *Erwinia rhapontici*, formando menor proporção de trealulose (apenas 4%). Os mesmos autores relataram posteriormente a expressão dos genes das enzimas sacarose isomerase produzidas pelos microrganismos *Pantoea dispersa* UQ68J, *Klebsiella planticola* UQ14S, e *Erwinia rhapontici* WAC2928, em *Escherichia coli*. A sacarose isomerase da primeira linhagem se diferenciou substancialmente mostrando maior produção de isomaltulose ao ser expressa pela bactéria *E. coli*. Após a purificação a enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0 e temperatura de 30 a 35°C , sendo que a produção de isomaltulose em relação a trealulose foi de 22:1 (Wu e Birch, 2005).

Uma linhagem de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 que produz a enzima trealulose sintase pertencente à família 13 glicosideo hidrolase, catalisa a isomerização da sacarose em isomaltulose e trealulose, como principais produtos,

com formação de glicose e frutose como produtos secundários da reação hidrolítica. Nesse trabalho foram realizados estudos cristalográficos dessa enzima de 64 kDa, para facilitar a compreensão da base molecular do processo de decomposição da sacarose, isomerização e a seletividade da enzima que permite a formação dos diferentes produtos. Logo, a enzima foi purificada e cristalizada (RAVAUD et al., 2005). Os mesmo autores realizaram outro trabalho em que estudaram a estrutura tridimensional da enzima sacarose isomerase, o que é de grande interesse para fornecer base para processos de engenharia de proteínas visando a otimização da produção industrial de isomaltulose (RAVAUD et al., 2006).

Cho et al. (2007) relataram o isolamento de um microrganismo produtor de isomaltulose de um total de 500 microrganismos a partir de alimentos tradicionais coreanos. A bactéria identificada como *Enterobacter* sp. FMB-1 apresentou conversão da sacarose em isomaltulose maior que 90% após dois dias. Também foram encontrados traços de trealulose, glicose e frutose.

Um estudo relata a produção de frutooligossacarídeos a partir de β -frutofuranosidase fúngica em sistema de leito fixo. Todavia, a solução de sacarose que não foi convertida em frutooligossacarídeo foi circulada por uma segunda coluna empacotada com células de *Protoaminobacter rubrum* imobilizadas para a conversão da sacarose resultante em isomaltulose (MARKOSYAN et al., 2007).

2.3 Imobilização de enzimas ou células

A imobilização de enzimas, de uma forma sucinta, corresponde à interação ou ligação química da enzima com determinado suporte insolúvel, ou seu confinamento dentro de uma matriz polimérica. Na década de 1960, houve um grande interesse na imobilização de enzimas devido à possibilidade de reutilização e aumento da estabilidade, todavia o confinamento e encapsulamento das enzimas não apresentaram muito sucesso, já que não permaneciam retidas

no suporte, além de existirem limitações quanto à transferência de massa, reduzindo assim o seu desempenho. Isso foi compensado com os progressos no entendimento do processo de desenvolvimento de microcápsulas para enzimas e a não necessidade de rendimentos máximos nas aplicações. Basicamente, as diferenças entre o encapsulamento de enzimas e células são: células são biocatalisadores de grandes dimensões (poucos micrômetros) ao contrário das enzimas (poucos nanômetros), assim, enquanto às células são realmente imobilizadas, as enzimas podem se difundir no suporte; as células podem se multiplicar quando encapsuladas e a perda de determinado número de células pode ser aceitável, uma vez que elas podem aumentar durante o processo de fermentação, diferentes das enzimas que podem ter sua concentração no suporte diminuída, porém isso pode ser compensado com aumento de atividade em alguns casos (PONCELET, 2006).

Em termos de aplicações industriais, a imobilização de enzimas e/ou células oferece diversas vantagens em relação à utilização do biocatalisador na sua forma livre, por exemplo, a possibilidade de reutilização, maior facilidade da separação do produto, aumento da estabilidade da enzima e possibilidade de processos contínuos (OLIVEIRA et al., 1997). Aliado as essas vantagens um processo de imobilização de enzimas pode resultar em alterações das propriedades bioquímicas da enzima na forma livre como faixas de pH e temperatura ótima de atividade enzimática, bem como aumento da estabilidade e variações nos valores de K_m e $V_{máx}$ (SANJAY e SUGUNAN, 2006).

Muitos suportes orgânicos e inorgânicos têm sido estudados para imobilização de enzimas. Suportes inorgânicos apresentam algumas vantagens como resistência a degradação microbiana, maior estabilidade térmica e menor custo (GOPINATH e SUGUNAN, 2004).

Dentre os suportes usados para a imobilização de enzimas em matriz polimérica destacam-se polissacarídeos capazes de gelificar instantaneamente em presença de íons, pelo processo de gelificação iônica, como a pectina com baixo teor de metoxilas (BTM) e alginato de sódio. Uma descrição do processo de

gelificação de pectina BTM e alginato corresponde ao modelo de caixa de ovo nos quais os íons cálcio formam um complexo com unidades adjacentes dos monômeros unindo duas cadeias do polissacarídeo (BRACCINI e PERÉZ, 2001).

Na conversão enzimática de sacarose em isomaltulose, o alginato de sódio é o suporte mais utilizado na imobilização de células de bactérias produtoras de glicosiltransferase (CHEETHAM et al., 1985). A imobilização de células em alginato de cálcio junto com aditivos, como a polietilenoimina e o glutaraldeído que permitem a melhor fixação das células no gel foi bastante estudada (SHIMIZU et al., 1982; KAWAGUTI et al., 2006). Todavia, para a imobilização de extratos enzimáticos, pode ser desvantajoso devido à desnaturação das enzimas. Por outro lado, visando à retenção de proteínas em hidrogéis é relatada na literatura a adição de gordura (CORREA et al., 2004).

Pectina é um polissacarídeo extraído da parede celular de plantas usado industrialmente como agente gelificante e espessante, sendo a casca de frutas cítricas e da maçã as principais fontes para a produção de pectina comercial. É constituída essencialmente por cadeias lineares de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -1,4, interrompidas randomicamente por pequenas frações de L-ramnose unidas por ligações 1,2 e cadeias laterais formada por outros açúcares (THAKUR et al., 1997). Este polissacarídeo é usualmente caracterizado quanto ao seu grau de metoxilas dos grupos carboxílicos, assim soluções aquosas de pectina com grau de esterificação inferior a 50% formam géis em presença de íon cálcio (IMESON, 1997). A gelificação ionotrópica da pectina BTM é um método simples, brando e barato, sendo o gel formado facilmente pelo gotejamento da solução de pectina em solução iônica como cloreto de cálcio.

Por ser considerada não tóxica e biocompatível, a pectina é interessante para aplicações em que ocorre a liberação controlada de drogas. Correa et al. (2004) verificaram que a adição de gordura vegetal hidrogenada aumenta a capacidade de retenção de caseína nos géis de pectina.

A imobilização de microrganismos em acetato de quitosana também tem sido relatada para a produção de isomaltulose. Krastanov e Yoshida (2003) realizaram estudo de imobilização das células de uma linhagem de *Serratia plymuthica* nesse material e observaram que as células imobilizadas apresentavam alta atividade e excelente estabilidade operacional. O biocatalizador foi capaz de converter totalmente a sacarose (solução a 40%) em 80% de isomaltulose e 7% de trealulose em uma batelada de 4 horas.

Outra técnica de imobilização de enzimas bastante descrita é a adsorção superficial do biocatalisador em um suporte, sendo essa a técnica mais simples de imobilização. Neste caso ocorre o contato do suporte com uma solução aquosa contendo a enzima, garantindo que esta irá penetrar nos poros do suporte. O volume da solução aquosa utilizada para o processo de imobilização é apenas o suficiente para cobrir todas as partículas. O excesso de água é posteriormente removido por liofilização. A literatura relata diversas enzimas imobilizadas por adsorção como lipase (DA SILVA et al., 2008), invertase (MANSOUR e DAWOUD, 2003) e β -galactosidase (GAUR et al., 2006).

Em um processo de imobilização de enzima por adsorção, baixas concentrações de enzima imobilizada resultam em baixa atividade enzimática devido à inativação da enzima pelo suporte, pois pode ocorrer alteração conformacional já que existe uma grande área de interação da enzima com o suporte. Em altas concentrações de enzima imobilizada, a transferência de massa pode apresentar limitações (MANSOUR e DAWOUD, 2003).

Uma metodologia muito interessante e eficiente para otimizar um processo de imobilização de enzimas ou células é a metodologia de superfície de resposta que permite avaliar diversas variáveis com um menor número de experimentos, bem como as interações que as variáveis possam apresentar. Mundra et al. (2007) otimizaram os parâmetros de imobilização das células de uma linhagem de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 em alginato de cálcio, para a produção de isomaltulose. As variáveis independentes do processo foram o diâmetro dos grânulos, a concentração do alginato e concentração de células. Foi observado

que após o processo de otimização, a conversão da sacarose em isomaltulose foi aumentado em 40%, alcançando uma produtividade máxima de 140mg/mL em uma batelada de uma hora, sendo as condições ótimas de imobilização: concentração do alginato de 5% (m/v), concentração das células de 5 g/L e grânulos de 2,25 mm de diâmetro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo produtor de glicosiltransferase

A linhagem de *Erwinia* sp. D12 que produz a glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose foi utilizada nesse trabalho. Este microrganismo foi isolado no laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP e foi cultivado em tubos de meio de cultivo inclinados, composto por agar nutriente e 0,5% de sacarose, durante 15 horas a 30°C. Posteriormente foi adicionado vaselina estéril e os tubos foram armazenados a 5°C com repicagem a cada dois meses.

3.2 Produção de glicosiltransferase

Para a produção de glicosiltransferase a cultura da linhagem de *Erwinia* sp. D12 foi pré-inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado por Kawaguti (2006) composto por melaço de cana-de-açúcar (Companhia Energética Santa Eliza) (150 g/L), água de maceração de milho (Milhocina[®]- Corn Products do Brasil) (20 g/L), extrato de levedura Prodex Lac SD[®] (Produtos Especiais para Alimentos S/A) (15 g/L), e pH ajustado para 7,5. Os frascos foram incubados em incubador com agitação New Brunswick Scientific Series 25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), a 200 rpm, 30°C, por 15 horas. Posteriormente, alíquotas de 5 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 45 mL do mesmo meio de cultivo estéril que foram incubados sob agitação a 200 rpm, 30°C, por 8 horas. Para a extração da glicosiltransferase, inicialmente, foi obtida a massa celular, através da centrifugação do meio de cultivo a 9632 x g por 15 minutos, a 5°C em centrífuga Beckman J2-21 (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, EUA). A massa celular foi lavada duas vezes com água destilada a 5°C e posteriormente ressuspendida em

água destilada a 5°C para concentração de 10% de massa celular úmida. As células (50 mL de suspensão celular) foram rompidas por tratamento em sonicador (Labline Instruments, Inc., IL, EUA) por 20 segundos a 180 – 200 W, sendo essa etapa repetida 15 vezes, com resfriamento entre cada operação. Após lise da parede celular as amostras foram centrifugadas a 9632 x g, a 5°C, por 15 minutos, obtendo-se o sobrenadante denominado de extrato enzimático bruto, utilizado para os ensaios com glicosiltransferase bruta.

3.3 Determinação da atividade de glicosiltransferase

A atividade de glicosiltransferase foi determinada através do aumento do poder redutor de uma solução contendo sacarose (Synth[®]), como descrito por Uekane (1993), com modificações. A mistura de 450 µL de solução de sacarose 10% (p/v) em solução tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 6,3 e 50 µL de solução enzimática foi incubada a 33°C por 25 minutos. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945). Foi preparado tubo branco substituindo-se a enzima por água destilada no sistema de reação. Uma unidade de atividade enzimática de glicosiltransferase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de isomaltulose/min/mL de enzima sob as condições de ensaio estabelecidas.

3.4 Purificação da glicosiltransferase

3.4.1 Cromatografia de troca iônica

A glicosiltransferase foi purificada por cromatografia de troca iônica em cromatógrafo líquido Akta Prime Plus (General Electric Company), acoplado com detector UV. Foi utilizada uma coluna de troca catiônica contendo a fase estacionária SP-Sepharose Fast Flow, volume interno igual a 1 mL e dimensões de 0,7 cm de diâmetro interno e 2,5 cm de comprimento. Foi injetada alíquota de 500 µL de extrato enzimático bruto utilizando como tampão de eluição citrato-fosfato pH 5,0 e 0,05 M. A eluição das proteínas retidas na coluna foi realizada utilizando gradiente de NaCl de 0 a 1 M, fluxo de 2 mL/min e a atividade de glicosiltransferase foi determinada nas frações obtidas, como descrito no item 3.3.

3.4.2 Determinação da massa molecular da glicosiltransferase produzida pela *Erwinia* sp. D12

A glicosiltransferase presente nos diferentes graus de purificação e os padrões de massa molecular, foram solubilizadas em solução tampão composto por dodecil sulfato de sódio (SDS) (2%), glicerol (10%), β-mercaptoetanol (5%), azul de bromofenol (ABF) (0,00125%), tampão tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (12,5%) até a concentração de 1 µg/µL. Foram aplicadas 50 uL das preparações protéicas no gel de poliacrilamida (12,5%) contendo 1% de SDS, sendo o tempo de corrida eletroforética de uma hora e trinta minutos e as condições elétricas iguais 120 V e 200 mA. Para a revelação, o gel foi colocado em recipiente com solução fixadora (metanol 50% e ácido acético glacial 10%) por trinta minutos. Posteriormente o gel foi colocado em recipiente com solução corante de Coomassie Brilliant Blue (CBG-250) por 2 horas e em seguida tratado com solução de ácido acético (10%), sob

agitação suave, sendo que essa solução foi trocada a cada 30 minutos, até perfeita visualização das bandas.

3.4.3 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas das preparações enzimáticas foi determinada pela metodologia proposta por Smith et al. (1985), utilizando albumina bovina como proteína padrão.

3.5 Caracterização da glicosiltransferase presente no extrato enzimático bruto e nos diferentes graus de purificação

3.5.1 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

Para determinar o efeito da concentração do substrato na atividade da enzima, alíquotas de 50 μL das preparações enzimáticas foram adicionados em tubos contendo 450 μL de solução de sacarose, em diferentes concentrações, em solução tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,3 e a atividade enzimática determinada como descrito no item 3.3. A constante de Michaelis-Menten e a velocidade máxima de reação foram determinadas segundo o sistema gráfico de LINEWEAVER-BURK (1934).

3.5.2 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Para determinar o efeito do pH e da temperatura na atividade das preparações enzimáticas foram utilizados sistemas de reação compostos por 450 μL de solução 10% de sacarose em diferentes soluções tampões 0,1 M (tampão citrato-fosfato pH 5,00; 5,4 e 6,3 e tampão fosfato de sódio pH 7,2 e 7,50) e 50 μL

de enzima. Os sistemas de reação foram incubados em diferentes temperaturas por 25 minutos, utilizando para estes experimentos planejamentos experimentais do tipo composto central rotacional 2^2 (Tabelas 2 e 3), para as diferentes aplicações enzimáticas, e posteriores análises das superfícies de resposta, nos quais as duas variáveis independentes foram os valores de pH e de temperatura e a variável dependente a atividade enzimática, analisada como descrito no item 3.3. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA[®] versão 5.1.

3.5.3 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática

Para determinar o efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima, a mistura de 50 μ L das preparações enzimáticas e 50 μ L de diferentes soluções tampões 0,1 M (tampão citrato-fosfato pH 3,8; 4,5 e 6,4 e tampão tris-HCl pH 8,3 e 9,0) foram pré-incubadas em diferentes valores de temperatura por uma hora. Após este período a atividade de glicosiltransferase foi determinada como descrito no item 3.3. Foram utilizados planejamentos experimentais do tipo composto central rotacional 2^2 (Tabelas 10 e 11), para as diferentes aplicações enzimáticas, e posteriores análises das superfícies de resposta, nos quais as duas variáveis independentes foram os valores de pH e de temperatura e a variável dependente a atividade enzimática. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA[®] versão 5.1.

3.6 Aplicação da glicosiltransferase na conversão da sacarose em isomaltulose

As preparações enzimáticas de glicosiltransferase bruta e purificada (frações nº 2 e nº 17) foram estudadas quanto ao seu potencial de converter sacarose em isomaltulose. Foi adicionado 2 mL das diferentes preparações enzimáticas a 8 mL de solução de sacarose em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,3 para a concentração final de 10% e incubados na temperatura ótima de 33°C. Alíquotas foram retiradas após 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h e a isomaltulose formada foi analisada como no item 3.8.

3.7 Imobilização da glicosiltransferase bruta

3.7.1 Imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

3.7.1.1 Otimização das condições do processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

Para o estudo de otimização da imobilização da glicosiltransferase presente no extrato enzimático bruto em Celite (Synth[®]) foi estudado o efeito de três importantes variáveis no processo: pH de adsorção da enzima no suporte, quantidade de enzima e concentração de glutaraldeído (Sigma Aldrich[®]), através de delineamento composto central rotacional 2³ (Tabelas 21 e 22) e posterior análise das superfícies de resposta, sendo a variável dependente a porcentagem de conversão de sacarose em isomaltulose. Para o processo de imobilização as misturas de enzima, 10 g de Celite e 40 mL de tampão 0,1 M, (citrato-fosfato pH 4,0 -5,6, tampão fosfato de sódio pH 6,5 – 8,0) foram adicionadas em frascos Erlenmeyers (100 mL). Os frascos foram colocados em agitação de 130 rpm por 12 horas em agitador/incubador a 5°C, posteriormente as amostras de

glicosiltransferase imobilizada em Celite foram filtradas e lavadas com 100 mL de água destilada gelada. Para os ensaios em que foi testado o glutaraldeído, as amostras de enzima imobilizada em Celite, incubadas a 130 rpm por 12 horas foram filtradas e transferidas para 40 mL de solução aquosa de glutaraldeído em diferentes concentrações por uma hora com agitação branda. Posteriormente, as preparações foram filtradas e lavadas com 100 mL de água destilada gelada. Finalmente, as amostras de glicosiltransferase imobilizadas em Celite foram adicionadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de solução aquosa de sacarose 10%, e incubadas a 130 rpm por duas horas e trinta minutos a 33°C. Foram realizadas três bateladas para avaliar a capacidade de retenção da enzima na Celite bem como o efeito do glutaraldeído, sendo a conversão da sacarose em isomaltulose analisada como descrito no item 3.8. Um segundo planejamento foi necessário para a otimização do processo, sendo que foi definido para todos os ensaios o tratamento da enzima imobilizada com 0,1% de glutaraldeído. Nesse segundo planejamento (2^2) (Tabelas 27 e 28) as variáveis independentes foram o pH de imobilização (citrato-fosfato pH 4,0 -5,5) e a quantidade de enzima e a variável dependente a porcentagem de isomaltulose convertida. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA[®] versão 5.1.

3.7.1.2 Otimização das condições de conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

Para determinar as condições ótimas de conversão da sacarose em isomaltulose pela enzima imobilizada em Celite, em sistema otimizado, foi estudado o efeito de três importantes variáveis no processo: pH do meio de reação (tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,5-6,3 e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3 e 8,0), temperatura e concentração de sacarose, através de um delineamento composto central rotacional 2^3 (Tabelas 31 e 32) e posterior análise

das superfícies de resposta, sendo a variável dependente a taxa de conversão da sacarose em isomaltulose. A enzima imobilizada foi incubada a 130 rpm por duas horas e trinta minutos junto com 50 mL de solução de sacarose e a taxa de conversão foi analisada como descrito do item 3.8. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA® versão 5.1.

3.7.1.3 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

3.7.1.3.1 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada

Para o estudo da reutilização da glicosiltransferase imobilizada em Celite, amostras de 10 g de enzima imobilizada nas condições otimizadas foram incubadas com 160 mL de solução de sacarose 30% em pH 6,3 (tampão citrato-fosfato, 0,1 M), em frascos Erlenmeyers (500 mL), a 22°C e agitação de 130 rpm. A solução de sacarose 30% em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,3 foi trocada a cada oito horas e alíquotas coletadas para a posterior determinação da taxa de conversão de sacarose em isomaltulose como descrito no item 3.8.

3.7.1.3.2 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leito empacotado

Para estudo da conversão da sacarose em isomaltulose em coluna de leito empacotado, 10 g de Celite contendo a enzima imobilizada nas condições otimizadas foram transferidas para coluna de leito empacotado encamisada (2,0 cm x 8 cm). Uma solução de sacarose 30% (p/v) em pH 6,3 (tampão citrato-fosfato 0,1 M) foi circulada no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 20 mL/h, e a conversão acompanhada por diferentes intervalos de tempo. A temperatura da

coluna foi mantida a 22°C e a taxa de conversão da sacarose em isomaltulose foi determinada como descrito no item 3.8.

3.7.2 Imobilização da glicosiltransferase bruta em gel de pectina BTM

Foi estudada a imobilização da glicosiltransferase bruta em gel de pectina cítrica amidada com baixo teor de metoxilação (BTM), doada pela Indústria Cp Kelco e o efeito da adição de fase gordurosa na retenção da enzima.

A suspensão de 2% (m/m) de pectina em água foi aquecida levemente até 60°C em placa de aquecimento com agitação até completa dissolução e em seguida resfriada até a temperatura ambiente. A mistura de 95 mL de suspensão de pectina, 5 mL de glicosiltransferase (23,39 U/mL) e 4 gotas de óleo resina de páprica foi homogeneizada em Ultra Turrax T-50 a 10000 rpm por um minuto. Em seguida a solução foi pulverizada a temperatura ambiente através de bomba peristáltica sobre pressão de ar de 0,15 kgf/cm², sendo a altura entre o pulverizador duplo fluído (1,5 mm de diâmetro) e a solução de CaCl₂ (2%, m/v) de 12 cm. As microcápsulas foram mantidas em solução de CaCl₂ por trinta minutos e em seguida filtradas em peneira (25 µm) e lavadas com 400 mL de água destilada, a 5°C.

No estudo do efeito da adição de gordura na imobilização da glicosiltransferase, a mistura de 93 mL de suspensão 2% de pectina, 2 g de manteiga e ácido oléico na proporção 1:1 (m:m) e 5 mL de glicosiltransferase (23,39 U/mL) foi homogeneizada e as microcápsulas foram preparadas como descrito anteriormente, como proposto por Correa et al. (2004) com modificações.

3.7.2.1 Caracterização físico-química das microcápsulas contendo glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM

As microcápsulas foram caracterizadas com relação à quantidade de proteínas pelo método de Kjeldahl, umidade determinada por secagem em estufa e eficiência de encapsulação (%E.E.) do material de recheio, calculada através da relação da concentração de proteínas totais remanescentes nas cápsulas após o processo de cura e da quantidade de proteínas presentes na solução, antes da formação das cápsulas, expressa em porcentagem, como ilustrado na Equação 1. Foi considerado que a concentração de proteínas presentes inicialmente, antes da formação das cápsulas, corresponde àquela presente em 5 mL do extrato enzimático bruto (15,12 mg proteína/mL).

$$\%E.E. = \frac{[\text{proteína encapsulada (g)} \times 100]}{[\text{proteína inicial (g)}]} \quad (\text{Equação 1})$$

3.7.2.2 Liofilização das microcápsulas

As microcápsulas contendo glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM com e sem a adição gordura foram liofilizadas para avaliar se o processo de secagem resultava em uma maior retenção da atividade enzimática. Inicialmente, as cápsulas recém preparadas foram congeladas a -18°C e posteriormente liofilizadas por 72 horas em liofilizador Edwards Super Modulyo (Virtis Company, NY, EUA).

3.7.2.3 Morfologia e microestrutura das microcápsulas

A análise morfológica e determinação do diâmetro das microcápsulas foram realizadas através de microscópio ótico NIKON (Eclipse E800 – Japan), utilizando-se objetiva de aumento de 10 vezes. A captação da imagem foi realizada pelo software Image Pró Plus 4.0.

A microestrutura das microcápsulas liofilizadas contendo glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM com e sem adição de gordura foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente as microcápsulas foram fixadas sobre “stubs” de alumínio por fitas metálicas de cobre e posteriormente recobertas por uma fina camada de ouro em um evaporador (Balzers – Sputter Coater SCD050) 40 mA/180s, a 24°C. Na seqüência foram observadas em microscópio eletrônico de varredura.

3.7.2.4 Determinação da atividade da glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM

Amostras de 20 g de microcápsulas de glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM foram adicionadas a 100 mL de solução 10% de sacarose em água destilada e a atividade enzimática determinada a 30°C, como descrito no item 3.3. A enzima imobilizada foi reutilizada em nova batelada a cada 30 minutos.

3.7.2.5 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM

3.7.2.5.1 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em pectina BTM contendo gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada

Neste estudo foi utilizada maior concentração de glicosiltransferase bruta (50% de enzima) para a preparação das microcápsulas. A mistura de 48 mL de solução 2% de pectina, 50 mL de glicosiltransferase bruta contendo (23,39 U/mL) e 2% de gordura [manteiga e ácido oléico, na proporção 1:1 (m:m)] foi homogeneizada e as microcápsulas foram preparadas como descrito no item anterior. Frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 20 g de microcápsulas de glicosiltransferase imobilizada e 160 mL de solução 10% de sacarose em água destilada foram incubados a 22°C com agitação a 130 rpm. A solução 10% de sacarose foi trocada a cada 8 horas e a taxa de conversão foi determinada como descrito no item 3.8.

3.7.2.5.2 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM contendo gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leito empacotado

Amostras de 20 g de microcápsulas de glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM contendo gordura, preparadas como descrito no item anterior foram transferidas para coluna de leito empacotado encamisada (2,0 cm x 8 cm). A solução de sacarose 10% (p/v) em água destilada foi circulada no sentido ascendente, utilizando-se fluxo de 20 mL/h, e a conversão acompanhada por diferentes intervalos de tempo. A temperatura da coluna foi mantida a 22°C e a conversão da sacarose em isomaltulose foi determinada como descrito no item 3.8.

3.8 Análise dos carboidratos formados

Os carboidratos formados foram analisados em cromatógrafo de íons DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. Foi utilizada coluna CarboPac™ PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac™ PA 1 (4 mm x 50 mm), e como fase estacionária solução de hidróxido de sódio 200 mM, com fluxo de 1 mL/min, a 20°C. A análise dos carboidratos foi realizada por comparação do tempo de retenção de padrões de frutose, glicose, sacarose e isomaltulose (Sigma Ultra®, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EUA). O padrão do carboidrato trealulose não está disponível comercialmente. De acordo com os trabalhos descritos na literatura as glicosiltransferases de *Erwinia* sp. e *Klebsiella* sp. convertem a sacarose em isomaltulose, e pequena concentração de trealulose, glicose e frutose. Desta forma o dissacarídeo formado durante a conversão de sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 foi considerado como trealulose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da glicosiltransferase

A purificação da glicosiltransferase da linhagem de *Erwinia* sp. D12 foi realizada como descrito no item 3.4.1. A enzima bruta apresentou atividade enzimática igual a 23,39 U/mL, concentração de proteína igual a 10,81 mg/mL e atividade específica de 2,16 U/mg (Tabela 1). Após a purificação por cromatografia de troca catiônica SP-Sepharose Fast Flow, obtiveram-se duas frações que apresentaram maiores atividade de glicosiltransferase (Figura 2). A fração n° 2 que corresponde às proteínas que não interagiram com a resina de troca catiônica, foi eluída rapidamente com tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0 e apresentou baixa atividade de glicosiltransferase (0,489 U/mL) e alta concentração de proteínas (1,53 mg/mL) (Tabela 1). A fração n° 17 foi adsorvida na resina, e posteriormente eluída com NaCl 0,8 M em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0. Esta fração apresentou atividade de glicosiltransferase igual a 1,55 U/mL e foi purificada cerca de 17,9 vezes.

Tabela 1. Purificação de glicosiltransferase de *Erwinia* sp D12

Etapa de purificação	Volume (mL)	Atividade de glicosiltransferase (U/mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Atividade específica (Unidades/mg de Proteína)	Atividade Total (U)	Grau de purificação	Rendimento (%)
Glicosiltransferase bruta	0,50	23,39	10,81	2,16	11,70	1,00	100,00
Fração n°2	1,00	0,49	1,53	0,32	0,49	0,15	4,18
Fração n°17	1,00	1,55	0,04	38,75	1,55	17,93	13,24

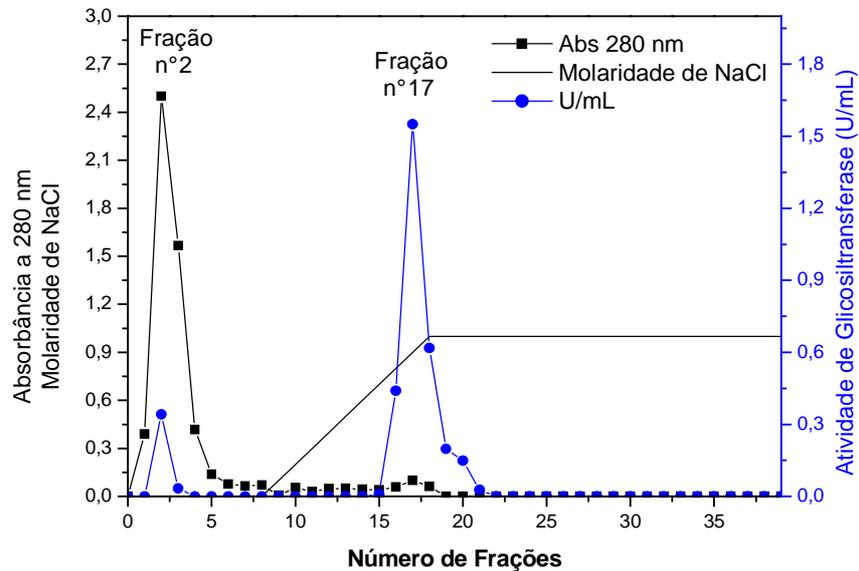


Figura 2. Eluição das proteínas e atividade de glicosiltransferase após cromatografia em coluna de SP-Sepharose Fast Flow

A glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose foi purificada (fração n° 17) utilizando um trocador catiônico com o fase estacionária. Esses resultados estão diferentes de alguns relatos anteriores que utilizaram trocadores aniônicos. Celestino (1998) purificou a glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 cerca de 28,5 vezes após etapa de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e equilibrada com tampão citrato-fosfato pH 7,0, 0,05 M. O autor relata que a enzima foi fracamente adsorvida na resina, sendo eluída rapidamente após a aplicação de tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 7,0. A preparação enzimática obtida apresentou atividade enzimática de 8,33 U/mL, e atividade específica igual a 41,65 U/mg. No trabalho de Park et al. (1992) foi isolado um microrganismo produtor de glicosiltransferase capaz de converter sacarose em isomaltulose que pertence ao gênero *Klebsiella* sp. A enzima foi extraída por ultrassonicação e purificada por precipitação com sulfato de amônio (80% de saturação) seguida de cromatografia

de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-50. A enzima após etapas de purificação apresentou um fator de purificação igual 5,1.

4.2 Determinação da massa molecular da glicosiltransferase produzida pela *Erwinia* sp. D12

A massa molecular da glicosiltransferase purificada da linhagem de *Erwinia* sp. D12 foi determinada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito no item 3.4.2. A Figura 3 ilustra que a fração n° 2 apresentou diversas proteínas indicando uma fração bastante impura. A fração n° 17 apresentou somente uma proteína correspondente a glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose. Após comparação com proteínas de massa molecular conhecida, o valor de massa molecular da glicosiltransferase presente na fração n° 17 foi estimado em 65 kDa (Figura 4).

A fração n° 2 apresentou baixa atividade de glicosiltransferase possivelmente devido à saturação da coluna ocasionada pela adsorção da glicosiltransferase, o que levou a eluição de uma pequena quantidade de enzima impossibilitada de interagir com as cargas da resina. Outra justificativa seria que a glicosiltransferase se apresenta como isoenzimas, com propriedades diferentes o que resultaria em interações diferentes com a fase estacionária. Todavia, deve-se considerar que não existem relatos na literatura que indiquem a existência de glicosiltransferase como diferentes isoformas.

Os resultados obtidos estão de acordo com relatos anteriores. Celestino (1998), após etapas de purificação observou, através de filtração em gel usando Sephadex G-200, que a glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 apresentava massa molecular de 63 kDa.

Park et al. (1996) purificaram a glicosiltransferase de *Klebsiella* sp., através de precipitação por sulfato de amônio, DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose, observando que a enzima apresentou massa molecular de 74 kDa.

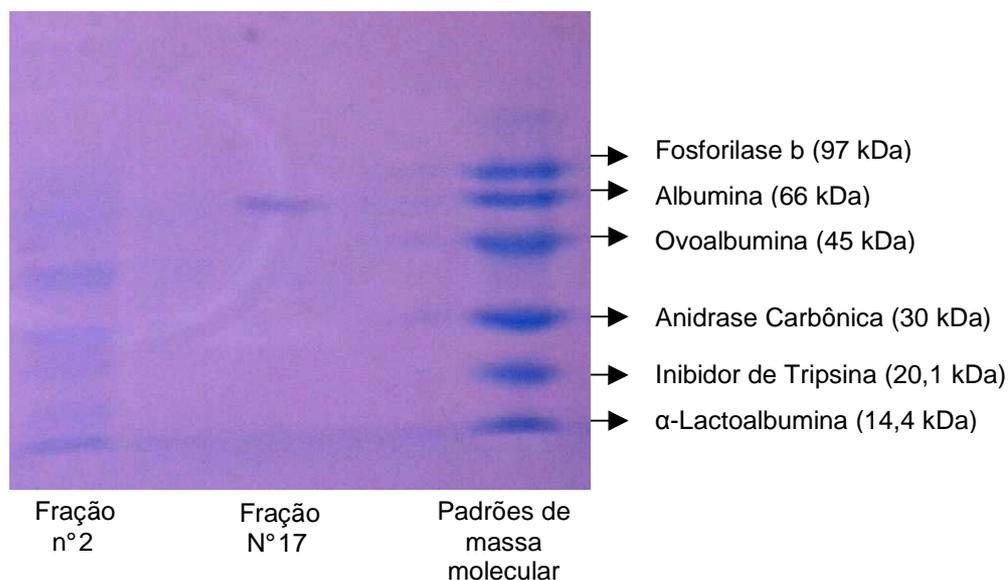


Figura 3. Eletroforese desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) das glicosiltransferases das frações n°2 e 17

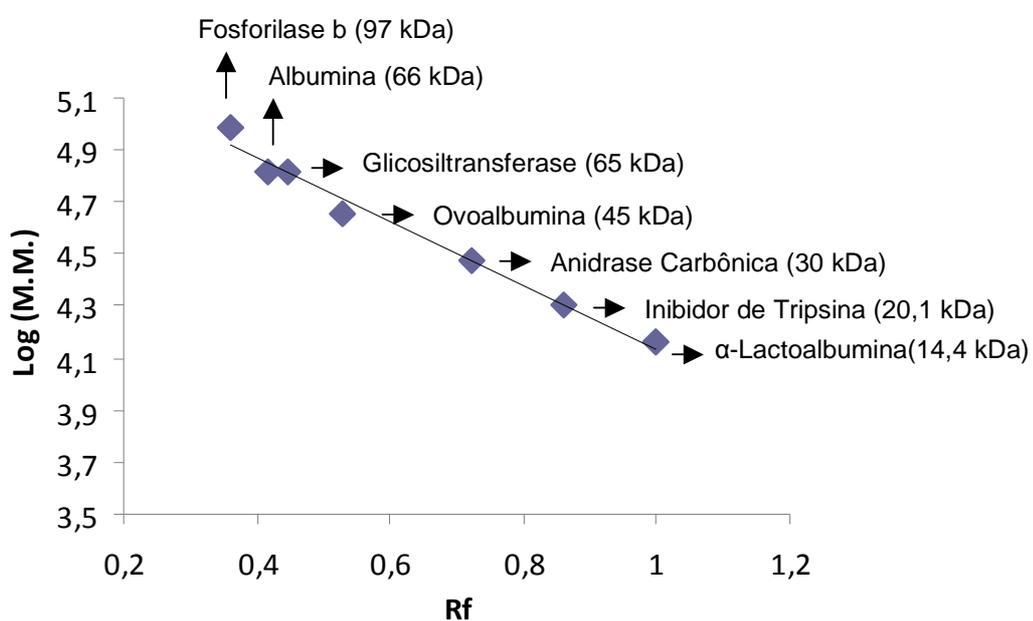


Figura 4. Relação entre Rf e Log da massa molecular das proteínas em gel de SDS – poliacrilamida para a determinação da massa molecular da glicosiltransferase purificada

4.3 Caracterização da glicosiltransferase bruta e das frações purificadas

4.3.1 Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

O efeito da concentração do substrato sacarose na atividade de glicosiltransferase nos diferentes graus de purificação, determinada como descrito no item 3.5.1, se encontra ilustrado na Figura 5. A velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) foi 27,41, 1,37 e 2,22 μmol de isomaltulose/minuto/mg de proteína para a enzima bruta, fração n° 2 e fração n° 17, respectivamente. As preparações de enzima bruta, fração n° 2 e fração n° 17 apresentam valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) iguais a 52, 54 e 49 mM de sacarose, respectivamente.

A constante de Michaelis-Menten corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e indica a afinidade da enzima pelo seu substrato. As três preparações apresentaram valores de K_m aproximados, ou seja, para fins de aplicação da enzima visando à obtenção de isomaltulose, deve-se considerar a velocidade máxima da reação. Logo, a enzima bruta, que apresenta valor de $V_{m\acute{a}x}$ superior às preparações purificadas seria mais interessante, pois resultaria na formação de isomaltulose mais rapidamente.

A glicosiltransferase purificada de *Klebsiella* sp. apresentou K_m igual a 20 mM e $V_{m\acute{a}x}$ igual a 110 μmol palatinose/min/mL (PARK et al., 1996). Celestino (1998) estudou a glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 observando que a enzima purificada por cromatografia de troca aniônica apresentava $V_{m\acute{a}x}$ igual 9,81 μmol de isomaltulose/minuto/mg de proteína e valor de K_m igual a 138 mM de sacarose.

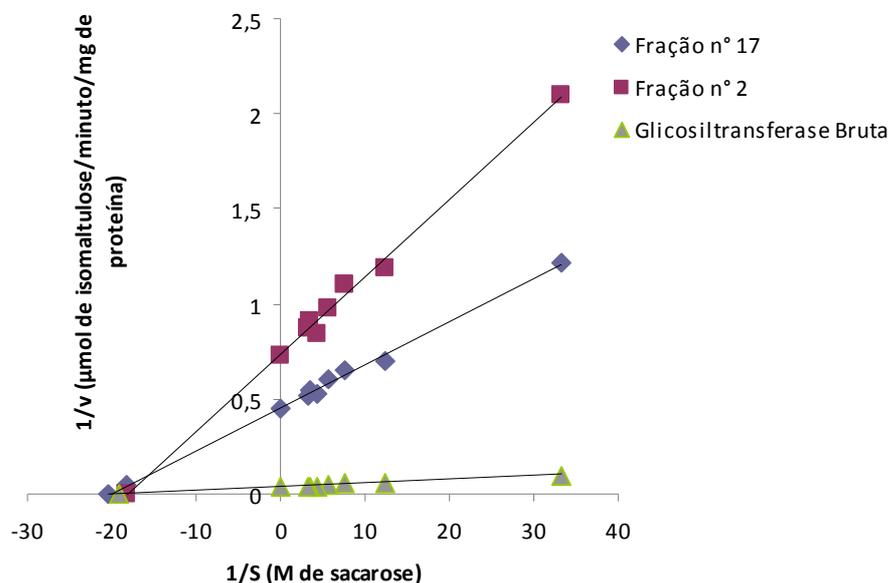


Figura 5. Efeito da concentração do substrato sacarose na atividade enzimática de glicosiltransferase nos diferentes graus de purificação

4.3.2 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH e da temperatura na atividade de glicosiltransferase foi determinado como descrito no item 3.5.2. Foi utilizado para cada uma das preparações um delineamento composto central rotacional 2^2 , sendo que os níveis estudados com os valores decodificados das variáveis se encontram na Tabela 2 e o planejamento ilustrado na Tabela 3. As variáveis independentes foram pH e temperatura e a dependente foi a atividade enzimática.

Observa-se na Tabela 3 que as três preparações enzimáticas apresentam perfis similares de atividade em função do pH e temperatura. Porém, deve-se salientar que apesar das maiores atividades serem as obtidas nos pontos centrais para todas as preparações, a enzima bruta apresenta maior atividade que as duas outras frações. A maior atividade da glicosiltransferase bruta foi 61,51 U/mL, da fração nº2 foi 3,19 U/mL e a da fração nº17 igual a 22,73 U/mL.

Tabela 2. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17

Variáveis	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	5,0	5,4	6,3	7,2	7,5
Temperatura (°C)	14,5	20,0	33,5	47,0	52,5

As Tabelas 4, 6 e 8, apresentam os coeficientes de regressão das variáveis independentes na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17, respectivamente. Observa-se que para a glicosiltransferase bruta e a fração nº 2 os fatores que foram estatisticamente significativos em intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) foram o termo quadrático da variável pH e linear e quadrático da temperatura, sendo que em nenhuma preparação estudada a interação entre as variáveis pH e temperatura foi estatisticamente significativa, na faixa estudada. Já a fração nº 17 apresentou como variáveis estatisticamente significativas a 90% de confiança ($p < 0,1$), o termo linear e quadrático do pH e da temperatura.

Tabela 3. Delineamento composto central rotacional 2² codificado para o estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração n°2 e fração n°17

Ensaio	Variável		Atividade da Glicosiltransferase bruta (U/mL)	Atividade da Glicosiltransferase da fração n°2 (U/mL)	Atividade da Glicosiltransferase da fração n°17 (U/mL)
	pH	Temperatura (°C)			
1	-1	-1	17,34	0,57	5,88
2	+1	-1	16,34	0,44	6,93
3	-1	+1	2,33	0,96	8,24
4	+1	+1	2,50	0,69	9,53
5	-1,41	0	23,39	0,59	5,11
6	+1,41	0	19,12	1,09	11,76
7	0	-1,41	17,45	0,44	2,94
8	0	+1,41	3,07	2,02	11,90
9	0	0	61,51	2,69	22,73
10	0	0	61,51	3,19	19,13
11	0	0	56,88	2,67	21,07
12	0	0	55,37	2,96	22,59

A partir dos valores do coeficiente de regressão pode-se obter um modelo matemático para o planejamento de cada preparação, o que possibilita a determinação da atividade em qualquer valor de pH e temperatura dentro da faixa estudada e podendo-se assim otimizar o valor de atividade enzimática. Entretanto, a validação e verificação da adequação dos modelos só foi possível após a realização da análise de variância (ANOVA), que pode ser observada nas Tabelas 5, 7 e 9 para a enzima bruta, fração n°2 e fração n°17, respectivamente. Assim a partir da ANOVA foi realizado o teste F em que o valor de F calculado para cada planejamento deve ser superior ao valor de F tabelado pré-determinado para que os modelos matemáticos sejam satisfatórios. Em todas as preparações os valores de F calculados foram superiores aos valores tabelados. Outro parâmetro

analisado é a porcentagem de variação explicada (R^2) que no caso da glicosiltransferase bruta, o valor de R^2 foi igual a 0,9812, indicando que 98,12% da variação total para a resposta atividade enzimática é atribuída ao modelo matemático (Equação 2), enquanto que 2% não é. No caso da Fração nº 2, em que o R^2 é igual a 0,9290, 92,90% da variação é atribuída ao modelo (Equação 3). A fração nº 17 apresenta R^2 igual a 0,9610, sendo que para essa fração é atribuído ao modelo (Equação 4) 96,10% da resposta.

Tabela 4. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	58,83	2,15	27,36	< 0,0001
(1) pH (L)	-0,86	1,52	-0,56	0,5932
pH (Q) *	-20,38	1,71	-11,94	< 0,0001
(2) Temperatura(L)*	-6,16	1,52	-4,04	0,0068
Temperatura(Q) *	-25,91	1,71	-15,17	< 0,0001
1L by 2L	0,29	2,15	0,14	0,8963

*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 5. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da glicosiltransferase bruta

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	6103,43	3	2034,48	138,84
Resíduos	117,23	8	14,65	
Falta de Ajuste	87,09	5		
Erro Puro	30,14	3		
Total	6220,66	11		

$$R^2 = 0,9812$$

$$F_{0,95;3;8} = 4,07$$

Atividade de Glicosiltransferase (U/mL) = 58,83 – 20,38.pH² – 6,16.Temperatura – 25,91.Temperatura² (Equação 2)

Tabela 6. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração n° 2

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	2,88	0,19	14,77	< 0,0001
(1) pH (L)	0,04	0,14	0,28	0,7910
pH (Q) *	-1,11	0,15	-7,21	0,0004
(2) Temperatura(L)*	0,36	0,14	2,60	0,0404
Temperatura(Q) *	-0,92	0,15	-5,94	0,0010
1L by 2L	-0,03	0,19	-0,18	0,8634

*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 7. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 2

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	12,91	3	4,30	36,46
Resíduos	0,94	8	0,12	
Falta de Ajuste	0,76	5		
Erro Puro	0,18	3		
Total	13,09	11		

$$R^2 = 0,9290$$

$$F_{0,95;3;8} = 4,07$$

Atividade Glicosiltransferase (U/mL) = $2,88 - 1,11 \cdot \text{pH}^2 + 0,36 \cdot \text{Temperatura} - 0,92 \cdot \text{Temperatura}^2$ (Equação 3)

Tabela 8. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 17

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	21,38	0,96	22,19	< 0,0001
(1) pH (L)*	1,47	0,68	2,15	0,07480
pH (Q) *	-6,56	0,76	-8,58	0,0001
(2) Temperatura(L)*	2,20	0,68	3,23	0,0178
Temperatura(Q) *	-7,07	0,76	-9,25	< 0,0001
1L by 2L	0,06	0,96	0,06	0,9524

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 9. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na atividade enzimática da fração nº 17

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	549,90	4	137,47	43,16
Resíduos	22,29	7	3,18	
Falta de Ajuste	13,85	4		
Erro Puro	8,44	3		
Total	572,19	11		

$$R^2 = 0,9610$$

$$F_{0,95;4;7} = 2,96$$

$$\text{Atividade de Glicosiltransferase (U/mL)} = 21,38 + 1,47.\text{pH} - 6,56.\text{pH}^2 + 2,20.\text{Temperatura} - 7,07.\text{Temperatura}^2 \text{ (Equação 4)}$$

Após as análises estatísticas e ajuste dos modelos para a atividade de glicosiltransferase nos diferentes graus de purificação, obteve-se as superfícies de resposta e curvas de contorno para cada preparação enzimática, como ilustrado na Figura 6. Pode-se observar que o perfil de atividade enzimática na faixa de pH e temperatura estudada das três preparações foi similar sendo a faixa ótima de atividade em temperatura de 30°C a 35°C e pH de 6,0 a 6,5, com pequenas variações entre as três preparações. Deve-se salientar que a faixa ótima de atividade é bastante estreita, sendo que em temperaturas maiores que 50°C e menores que 15°C, e pH maiores que 7,5 e menores que 5,0 a atividade enzimática da glicosiltransferase das três preparações é desconsiderável.

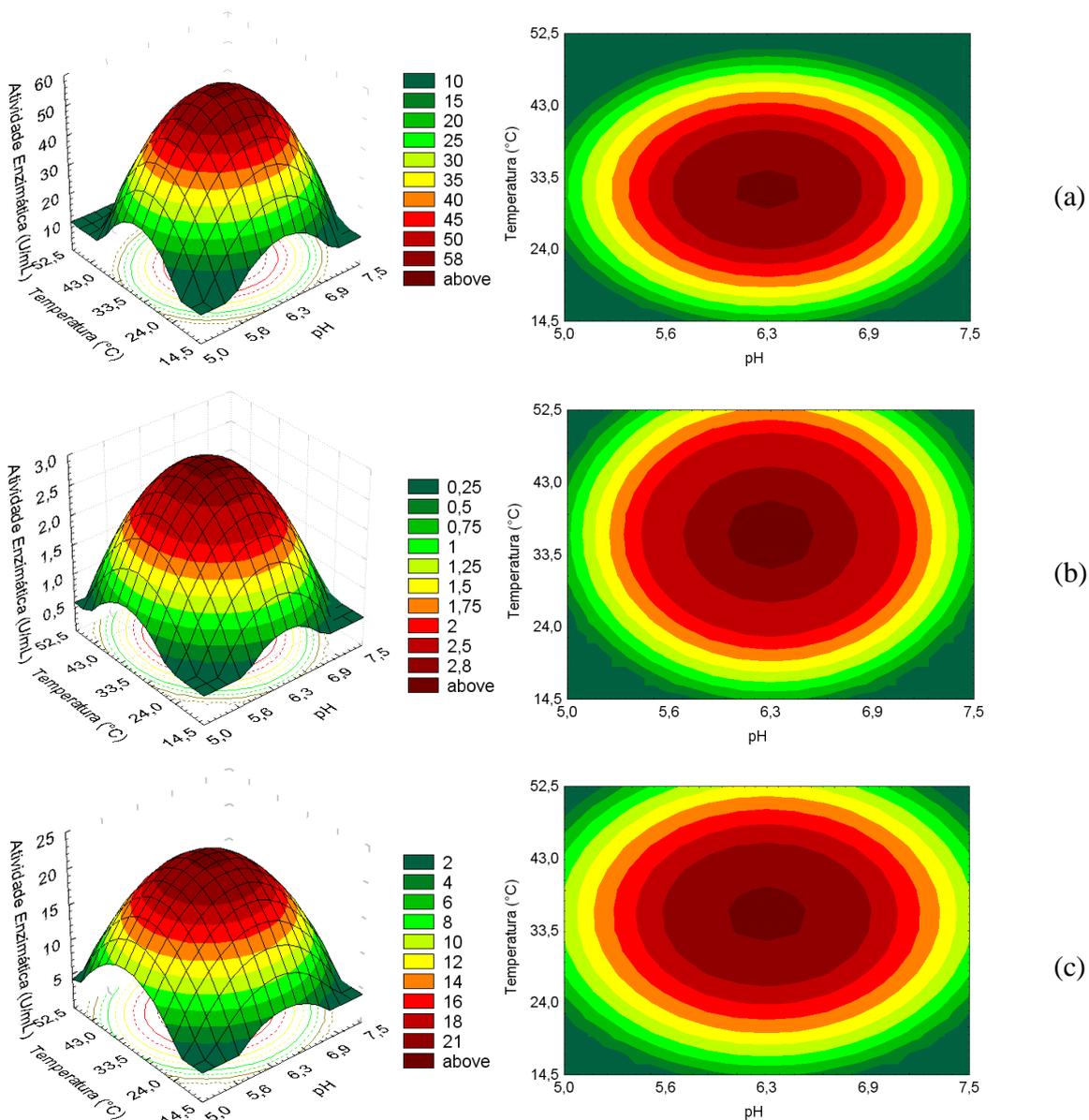


Figura 6. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de glicosiltransferase em função do pH e temperatura de reação

(a) Glicosiltransferase bruta; (b) Glicosiltransferase purificada da fração nº 2
Glicosiltransferase purificada da fração nº 17

Esses resultados estão de acordo com a literatura, como no trabalho de Park et al., (1996) que estudaram a glicosiltransferase produzida pela *Klebsiella* sp. e observaram que a enzima purificada, em estudo univariável, apresentava valores de atividade ótima nas faixas de pH entre 6,0 e 6,5, e temperatura de 35°C. Neste trabalho também foi relatado que a enzima era inibida por Hg²⁺ e Ag⁺, porém a presença de p-cloromercuribenzoato não apresentou efeito na atividade enzimática.

Véronèse e Perlot (1999) purificaram a sacarose isomerase de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 e observaram, em estudo univariável, que a enzima apresentava atividade ótima em pH 6,2 e temperatura de 30°C. A enzima purificada catalisou a conversão de sacarose nos produtos isomaltulose, trealulose, glicose, frutose, isomelezitose e isomaltose, sendo que a proporção desses carboidratos variou de acordo com o pH e temperatura de reação.

A isomaltulose sintase da linhagem *Klebsiella* sp. LX3 foi clonada, purificada, caracterizada e apresentou atividade ótima em pH 6,5 e 35°C (ZHANG et al., 2002).

4.3.3 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade enzimática

O efeito do pH e temperatura na estabilidade das diferentes preparações de glicosiltransferase foi determinado como descrito no item 3.5.3. Foi utilizado para cada enzima um delineamento composto central rotacional 2². Os níveis estudados, com valores decodificados das variáveis se encontram na Tabela 10 e o planejamento ilustrado na Tabela 11. As variáveis independentes foram pH e temperatura de estabilidade e a dependente foi a atividade enzimática relativa.

Os coeficientes de regressão das variáveis independentes na atividade enzimática relativa das preparações de glicosiltransferase bruta, fração n° 2 e fração n° 17 encontram-se ilustrados nas Tabelas 12, 14 e 16, respectivamente. Em todas as preparações enzimáticas o intervalo de confiança utilizado foi de 90%

($p < 0,1$). A Tabela 12 indica que para a glicosiltransferase bruta os fatores estatisticamente significativos foram o termo quadrático do pH, termo linear e quadrático da temperatura e a interação entre o pH e a temperatura. Na Tabela 14 observa-se que para a glicosiltransferase da fração nº 2, os fatores estatisticamente significativos foram os termos linear e quadrático do pH e da temperatura, bem como a interação entre o pH e a temperatura. Já para a glicosiltransferase da fração nº 17, os fatores estatisticamente significativos foram o termo quadrático do pH, linear da temperatura, e interação entre o pH e a temperatura (Tabela 16).

Os modelos matemáticos (Equações 5, 6 e 7) para cada preparação enzimática permitiram encontrar o valor de atividade relativa ótima para as enzimas, bem como o valor de atividade para qualquer valor de temperatura e pH que se encontrar na faixa estudada. Através da ANOVA que pode ser observada na Tabela 13 para a enzima bruta, Tabela 15 para a fração nº 2 e Tabela 17 para a fração nº 17, pode-se validar os modelos, uma vez que o teste F calculado para todas as preparações foi maior que o valor de F tabelado. Com relação aos valores de R^2 , o modelo obtido para a predição da resposta da enzima bruta, é capaz de explicar 96,65% (Tabela 13) das variações das respostas. Os modelos das frações nº 2 e nº 17 explicam 94,82% e 91,21% das possíveis respostas (atividade relativa), respectivamente.

Tabela 10. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração nº 2 e fração nº 17 por 1 hora de armazenamento

Variáveis	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	3,8	4,5	6,4	8,3	9,0
Temperatura (°C)	15,0	20,0	32,50	45,0	50,0

Tabela 11. Delineamento composto central rotacional 2² codificado para o estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta, fração n°2 e fração n°17 por 1 hora de armazenamento

Ensaio	Variável		Atividade	Atividade	Atividade
	pH	Temperatura (°C)	Relativa Extrato Bruto (%)	Relativa Fração n°2 (%)	Relativa Fração n°17 (%)
1	-1	-1	92,57	63,59	66,45
2	+1	-1	62,04	47,10	36,82
3	-1	+1	0,25	ND	ND
4	+1	+1	12,77	29,41	22,53
5	-1,41	0	0,58	ND	ND
6	+1,41	0	17,79	29,56	25,40
7	0	-1,41	100	100	100
8	0	+1,41	0,81	ND	ND
9	0	0	86,35	62,21	46,64
10	0	0	79,16	69,51	46,00
11	0	0	94,37	70,14	44,09
12	0	0	90,89	71,28	53,16

ND – Não detectada

Tabela 12. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	87,66	5,25	16,68	< 0,0001
(1) pH (L)	0,79	3,72	0,21	0,8400
pH (Q) *	-36,34	4,17	-8,71	0,0001
(2) Temperatura(L)*	-35,29	3,72	-9,49	< 0,0001
Temperatura(Q)*	-15,60	4,17	-3,74	0,0096
1L by 2L*	10,76	5,25	2,05	0,0864

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 13. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da glicosiltransferase bruta

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	19246,01	4	4811,50	50,46
Resíduos	667,41	7	95,34	
Falta de Ajuste	537,98	4		
Erro Puro	129,42	3		
Total	19913,42	11		

$R^2 = 0,9665$

$F_{0,95;4;7} = 2,96$

Atividade Relativa (%) = $87,66 - 36,34.pH^2 - 35,29.Temperatura - 15,60.Temperatura^2 + 10,76.pH.Temperatura$ (Equação 5)

Tabela 14. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº2

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	68,28	5,12	13,34	< 0,0001
(1) pH (L)*	6,84	3,62	1,89	0,1079
pH (Q)*	-26,19	4,06	-6,44	0,0006
(2) Temperatura(L)*	-27,87	3,62	-7,69	0,0002
Temperatura(Q) *	-8,48	4,06	-2,09	0,0820
1L by 2L*	11,47	5,12	2,24	0,0662

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 15. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº2

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	11521,41	5	2304,28	21,98
Resíduos	628,96	6	104,82	
Falta de Ajuste	578,15	3		
Erro Puro	50,81	3		
Total	12150,37	11		

$R^2 = 0,9482$

$F_{0,95;5;6} = 3,11$

Atividade Relativa (%) = $68,28 + 6,84 \cdot \text{pH} - 26,19 \cdot \text{pH}^2 - 27,87 \cdot \text{Temperatura} - 8,48 \cdot \text{Temperatura}^2 + 11,47 \cdot \text{pH} \cdot \text{Temperatura}$ (Equação 6)

Tabela 16. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº 17

	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(6)	p
Média*	47,47	5,57	8,53	0,0001
(1) pH (L)	3,60	3,94	0,91	0,3964
pH (Q) *	-17,44	4,42	-3,94	0,0075
(2) Temperatura(L)*	-27,80	3,94	-7,05	0,0004
Temperatura(Q)	1,32	4,42	0,29	0,7751
1L by 2L*	13,04	5,57	2,34	0,0576

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 17. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura na estabilidade enzimática da fração nº 17

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	8913,66	3	2971,22	27,69
Resíduos	858,37	8	107,29	
Falta de Ajuste	811,72	5		
Erro Puro	46,65	3		
Total	9772,03	11		

$R^2 = 0,9121$

$F_{0,95;3;8} = 2,92$

Atividade Relativa (%) = $48,52 - 17,70.pH^2 - 27,80.Temperatura + 13,04.pH.Temperatura$ (Equação 7)

As superfícies de resposta e curvas de contorno para as três preparações enzimáticas se encontram na Figura 7. A Figura 7a indica que a glicosiltransferase bruta mantém mais de 90% de sua atividade enzimática após ser armazenada na faixa de pH de 5,0 a 7,0, e temperatura inferiores a 30°C, após uma hora. Observa-se ainda que em temperaturas maiores que 40°C a enzima apresenta menos que 50% de atividade enzimática na faixa ótima de pH de estabilidade, porém nesta faixa de temperatura e em valores inferiores ou superiores de pH a atividade pode ser quase totalmente desconsiderada. Um perfil similar é observado para a glicosiltransferase purificada das frações nº2 e 17 (Figuras 7b e 7c), porém estas se mostraram mais instáveis. A Figura 7b indica que a glicosiltransferase purificada da fração nº2 mantém quase 100% de sua atividade após ser armazenada entre a faixa de pH de 5,7 e 6,5 por 1 hora e temperatura menores ou iguais a 16°C. Assim, em valores de temperatura maiores que 50°C mesmo ao ser armazenada em seu pH ótimo de armazenamento a enzima presente nessa fração apresenta atividade relativa muito baixa (menores que 20%). A glicosiltransferase purificada da fração nº 17 incubada a 15°C durante 1 hora apresentou maior estabilidade na faixa de pH 5,0 - 6,0 (Figura 7c).

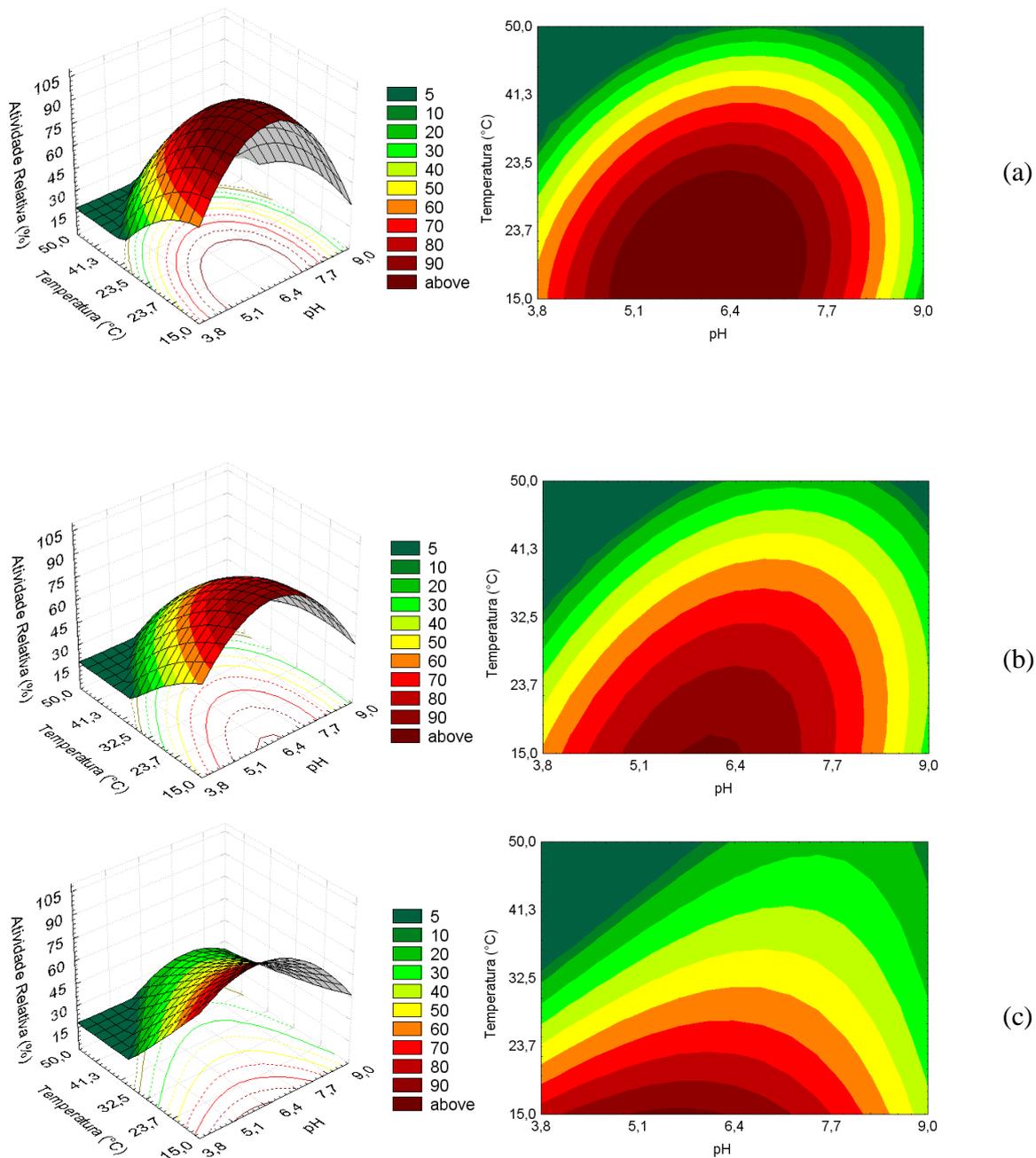


Figura 7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade relativa de glicosiltransferase em função do pH e temperatura na estabilidade da glicosiltransferase

(a) Glicosiltransferase bruta; (b) Glicosiltransferase purificada da fração nº 2
 Glicosiltransferase purificada da fração nº 17

Celestino (1998) observou que em estudo univariável, a glicosiltransferase purificada de *Erwinia* sp D12 apresentava estabilidade em ampla faixa de pH (5,0-8,0) após incubação durante 24 horas a 5°C, porém a enzima armazenada em pH 6,0 e temperaturas superiores a 45°C por 1 hora, tinha sua atividade diminuída para a metade, sendo que o mesmo acontecia quando a enzima era armazenada em temperaturas maiores ou iguais a 20°C por 24 horas.

Zhang et al. (2002) relataram que a isomaltulose sintase da linhagem *Klebsiella* sp. LX3 clonada apresentava-se termoestável após alteração nos aminoácidos da enzima, permitindo com que sua meia-vida, a 50°C, fosse aumentada em 11 vezes.

4.4 Aplicação da glicosiltransferase na conversão da sacarose em isomaltulose

A glicosiltransferase das preparações bruta e purificadas (frações nº 2 e 17) foi aplicada na conversão da sacarose em isomaltulose, como descrito no item 3.6. Pode ser observada na Tabela 18 que a enzima bruta apresenta alta capacidade de converter sacarose em isomaltulose, sendo quase todo o substrato convertido em 4 horas, resultando na porcentagem máxima isomaltulose (59,52%) formada. Observa-se que em maiores períodos de tempo de reação a porcentagem de isomaltulose diminui e a de trealulose aumenta, sendo que esta última chega a 42,18%, em 24h. A porcentagem de glicose formada aumenta gradualmente até 4h, diminuindo até não ser mais formada em 12 e 24h de reação. Já a frutose tem sua porcentagem aumentada até 8h de reação, porém quando a reação ocorre em um maior tempo sua concentração diminui.

Tabela 18. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta em diferentes tempos de reação

Carboidratos (%)	Tempo de reação (horas)					
	1h	2h	4h	8h	12h	24h
Glicose	1,30	2,54	3,34	1,52	ND	ND
Frutose	0,83	2,16	2,17	2,58	0,39	0,81
Trealulose	18,35	31,74	34,74	37,17	42,09	42,18
Sacarose	44,40	4,08	0,22	0,25	ND	ND
Isomaltulose	35,12	58,47	59,52	58,46	57,52	55,14

ND – Não detectada

As preparações purificadas de glicosiltransferase frações nº 2 e 17 apresentam perfis similares de conversão de sacarose em isomaltulose como pode ser observado nas Tabelas 19 e 20. A glicosiltransferase da fração nº 2 apresentou porcentagem máxima de isomaltulose igual a 63,78% e a fração nº 17 igual a 63,04%. Observa-se que a glicosiltransferase presente nas duas frações converteu quase toda a sacarose em 24h de reação, resultando em valores de conversão superiores quando comparados com a glicosiltransferase bruta. Os valores de produção de trealulose para essas preparações são inferiores aos encontrados no estudo realizado com a glicosiltransferase bruta. Uma possível explicação para esse fato é que as preparações da fração nº 2 e nº 17 não converteram toda a sacarose em isomaltulose, enquanto que a enzima bruta converte quase completamente a sacarose em isomaltulose em 4 horas. Logo, pode ser observado que os valores de trealulose encontrados no estudo realizado enzima bruta tendem a aumentar quando a sacarose está quase completamente consumida e o de isomaltulose diminuir, assim como nas posteriores horas de reação.

Tabela 19. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase purificada da fração n°2 em diferentes tempos de reação

Carboidratos (%)	Tempo de reação (horas)					
	1h	2h	4h	8h	12h	24h
Glicose	0,47	0,82	1,18	1,67	1,87	0,44
Frutose	0,23	0,49	0,67	1,05	1,36	1,73
Trealulose	7,31	11,06	15,17	21,94	25,54	30,94
Sacarose	80,45	68,09	54,85	31,61	18,75	3,11
Isomaltulose	11,70	19,53	28,07	43,84	52,08	63,78

Tabela 20. Conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase purificada da fração n°17 em diferentes tempos de reação

Carboidratos (%)	Tempo de reação (horas)					
	1h	2h	4h	8h	12h	24h
Glicose	0,59	0,74	1,23	1,63	2,48	2,45
Frutose	0,25	0,26	0,74	0,96	1,42	1,61
Trealulose	6,69	0,62	15,8	21,94	26,05	30,48
Sacarose	80,31	69,27	51,31	31,61	17,45	2,41
Isomaltulose	12,15	19,12	30,88	43,84	52,60	63,04

4.5 Imobilização da glicosiltransferase bruta

4.5.1 Imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

4.5.1.1 Otimização das condições do processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

Com o objetivo de aplicar a glicosiltransferase bruta imobilizada para a conversão da sacarose em isomaltulose, foi realizado estudo de imobilização da enzima por adsorção em Celite, visando à otimização do processo como descrito no item 3.7.1.1. Para esta etapa foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2³, sendo as variáveis independentes o pH de adsorção da enzima no suporte, quantidade de enzima e a concentração do agente glutaraldeído e a variável dependente a porcentagem de conversão da sacarose em isomaltulose. Os níveis estudados, com valores decodificados das variáveis se encontram na Tabela 21 e o planejamento ilustrado na Tabela 22. As análises estatísticas foram realizadas apenas para os resultados obtidos na primeira batelada (Tabela 22), porém para avaliar a influência do glutaraldeído na retenção da enzima, foram comparados os resultados de conversão de todos os 17 ensaios em três bateladas de duas horas e trinta minutos (Tabelas 22, 23 e 24).

Inicialmente, observando as Tabelas 22, 23 e 24, pode-se notar que o ensaio n° 13 que corresponde ao ensaio sem a adição do glutaraldeído, a atividade de glicosiltransferase tende a diminuir com a realização das bateladas o que não é observado nos demais ensaios. Assim, foi atribuído ao glutaraldeído um efeito positivo no processo. Também deve-se destacar que o ensaio n° 3 resultou em maior conversão de sacarose em isomaltulose de aproximadamente 22% nas três bateladas. Nesse ensaio foi utilizado 870 U de glicosiltransferase, pH 5,5 e 0,1% de glutaraldeído. Observou-se que os maiores valores de conversão da sacarose em isomaltulose foram obtidos nos ensaios realizados com menores

valores de pH, maiores quantidades de enzima e menores concentrações de glutaraldeído (Tabelas 22, 23 e 24).

Nessa etapa do estudo não foi analisado se maiores períodos de tempo de reação resultariam em maiores valores de conversão de sacarose em isomaltulose, pois se pretendia apenas analisar a influência das três variáveis em questão. Assim, em experimentos posteriores de aplicação um maior período de tempo foi analisado.

Tabela 21. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^3 para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

Variáveis	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	5,0	5,6	6,5	7,4	8,0
Enzima (U)	141	326	598	870	1055
Glutaraldeído (%)	0,00	0,10	0,25	0,40	0,50

Tabela 22. Delineamento composto central rotacional 2³ codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; primeira batelada

Ensaio	Variável			Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
	pH	Enzima (U)	Glutaraldeído (%)					
1	-1	-1	-1	ND	ND	4,73	87,89	7,38
2	+1	-1	-1	ND	ND	ND	100	ND
3	-1	+1	-1	ND	ND	14,07	64,01	21,92
4	+1	+1	-1	ND	ND	ND	98,66	1,34
5	-1	-1	+1	ND	ND	ND	98,49	1,51
6	+1	-1	+1	ND	ND	ND	100	ND
7	-1	+1	+1	0,81	ND	7,29	79,14	12,75
8	+1	+1	+1	ND	ND	ND	100	ND
9	-1,68	0	0	1,05	ND	11,73	67,41	19,81
10	+1,68	0	0	ND	ND	ND	100	ND
11	0	-1,68	0	ND	ND	ND	100	ND
12	0	+1,68	0	ND	ND	4,60	88,18	7,23
13	0	0	-1,68	ND	ND	9,91	73,40	16,94
14	0	0	+1,68	ND	ND	2,14	94,38	3,25
15	0	0	0	1,45	ND	2,54	91,71	4,31
16	0	0	0	ND	ND	3,62	90,20	6,18
17	0	0	0	1,5	ND	2,52	91,53	4,45

ND – Não detectada

Tabela 23. Delineamento composto central rotacional 2³ codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; segunda batelada

Ensaio	Variável			Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
	pH	Enzima (U)	Glutaraldeído (%)					
1	-1	-1	-1	ND	ND	5,13	87,32	7,38
2	+1	-1	-1	ND	ND	ND	100	ND
3	-1	+1	-1	1,06	ND	14,39	63,62	21,92
4	+1	+1	-1	ND	ND	1,23	96,98	1,34
5	-1	-1	+1	ND	ND	ND	100,00	ND
6	+1	-1	+1	ND	ND	ND	100,00	ND
7	-1	+1	+1	ND	ND	5,38	85,89	8,73
8	+1	+1	+1	ND	ND	ND	98,48	1,52
9	-1,68	0	0	0,86	ND	11,69	69,73	18,09
10	+1,68	0	0	ND	ND	ND	100,00	ND
11	0	-1,68	0	ND	ND	ND	100	ND
12	0	+1,68	0	ND	ND	5,45	86,55	8,00
13	0	0	-1,68	ND	ND	9,26	76,62	14,12
14	0	0	+1,68	ND	ND	1,94	95,18	2,87
15	0	0	0	1,45	ND	4,20	89,47	6,33
16	0	0	0	1,19	ND	3,95	88,41	5,96
17	0	0	0	ND	ND	3,36	91,52	5,11

ND – Não detectada

Tabela 24. Delineamento composto central rotacional 2³ codificado para o estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite; terceira batelada

Ensaio	Variável			Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
	pH	Enzima (U)	Glutaraldeído (%)					
1	-1	-1	-1	ND	ND	5,3	85,67	9,03
2	+1	-1	-1	ND	ND	ND	100	ND
3	-1	+1	-1	1,55	1,5	15,5	57,81	23,63
4	+1	+1	-1	ND	ND	ND	98,41	1,59
5	-1	-1	+1	ND	ND	1,08	97,33	1,59
6	+1	-1	+1	ND	ND	ND	100	ND
7	-1	+1	+1	0,81	ND	6,03	82,52	10,64
8	+1	+1	+1	ND	ND	ND	98,85	1,15
9	-1,68	0	0	1,01	ND	12,61	66,06	20,32
10	+1,68	0	0	2,37	1,5	ND	95,04	0,09
11	0	-1,68	0	ND	ND	ND	100	ND
12	0	+1,68	0	ND	ND	4,80	88,01	7,19
13	0	0	-1,68	ND	ND	7,28	81,18	11,54
14	0	0	+1,68	0,55	1,40	2,56	91,72	3,77
15	0	0	0	ND	ND	3,00	92,38	4,62
16	0	0	0	ND	ND	2,69	93,20	4,29
17	0		0	1,50	ND	3,38	91,27	5,35

ND – Não detectada

Os resultados dos coeficientes regressão se encontram na Tabela 25 e se pode observar que no intervalo de confiança de 90% ($p < 0,1$) as variáveis estatisticamente significativas no processo foram os termos linear e quadrático do pH, linear da quantidade de enzima, linear e quadrático do glutaraldeído, além das interações da variável pH com a variável quantidade de enzima e do pH com o glutaraldeído.

O modelo matemático do processo (Equação 8) foi validado após a ANOVA (Tabela 26), sendo que o teste F foi bastante satisfatório. O R^2 do sistema obtido

foi 0,9337, indicando que 93,73% das respostas são explicadas pelo modelo matemático criado.

Tabela 25. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH, quantidade de enzima, glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada

	Coefficiente			
	de	Erro Padrão	t(7)	p
	regressão			
Média*	5,14	1,40	3,66	0,0080
(1)pH (L) *	-5,53	0,66	-8,39	< 0,0001
pH (Q)*	1,20	0,73	1,65	0,1424
(2)Enzima (L) *	2,88	0,66	4,36	0,0033
Enzima (Q)	-1,03	0,73	-1,41	0,1998
(3)Glutaraldeído(L) *	-2,89	0,66	-4,38	0,0032
Glutaraldeído(Q)*	1,27	0,73	1,74	0,1245
1L by 2L*	-3,05	0,86	-3,55	0,0094
1L by 3L*	1,71	0,86	1,99	0,0870
2L by 3L	-0,58	0,86	-0,67	0,5222

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Tabela 26. Análise de variância no estudo da influência do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	789,94	7	112,85	18,10
Resíduos	56,10	9	6,23	
Falta de Ajuste	53,93	7		
Erro Puro	2,17	2		
Total	846,04	16		

$$R^2 = 0,9337$$

$$F_{0,95;7;9} = 2,51$$

Isomaltulose (%) = 3,83 – 5,53.pH + 1,50.pH² + 2,88.Enzima – 2,88.Glutaraldeído + 1,57Glutaraldeído² – 3,05.pH. Enzima + 1,71.pH.Glutaraldeído (Equação 8)

As superfícies de resposta e curvas de contorno podem ser observadas na Figura 8, indicando que os melhores valores de pH para o processo de imobilização de glicosiltransferase bruta em Celite foram os inferiores, indicando que em pH 5,0 a enzima apresenta maior atividade. Na faixa estudada a quantidade de enzima correspondente a 1055 U resultaria no maior valor de conversão de sacarose em isomaltulose obtida (>40%). O glutaraldeído foi prejudicial para a atividade da enzima indicando que o melhor resultado de conversão de sacarose em isomaltulose foi obtido quando este agente não foi adicionado no processo, porém devido a manutenção das taxas de conversão (Tabelas 22, 23 e 24), excetuando o ensaio 13 (sem tratamento), uma menor concentração do agente foi definida (0,1%).

Como a variável pH e quantidade de enzima ainda não foram otimizadas foi realizado um segundo planejamento avaliando diferentes faixas das variáveis em questão, tratando todos os ensaios com 0,1% de glutaraldeído.

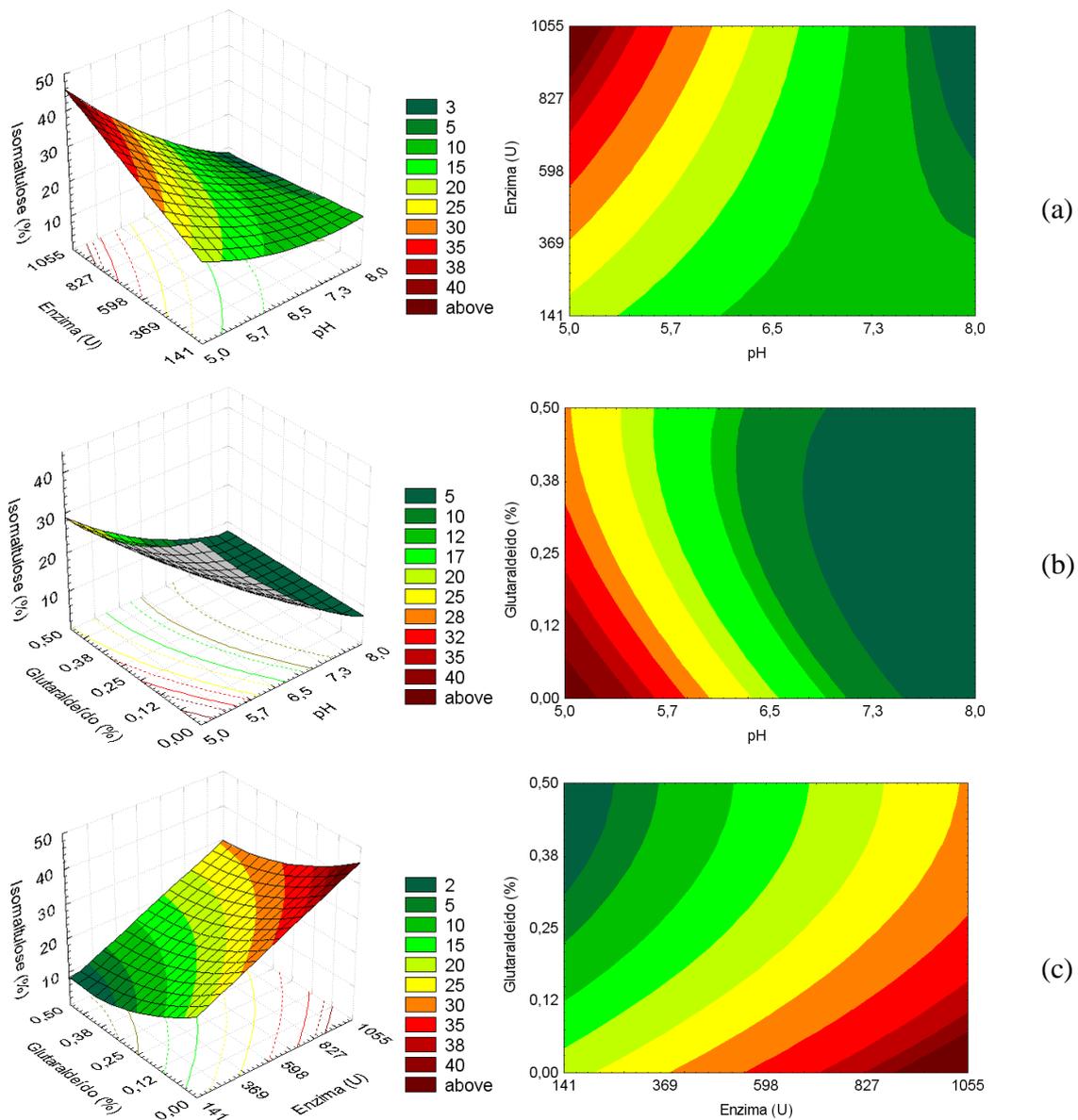


Figura 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH, quantidade de enzima e glutaraldeído, no processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite, obtidos a partir da análise dos resultados da primeira batelada

(a) em função do pH e quantidade de enzima; (b) em função do pH e glutaraldeído; (c) em função da quantidade de enzima e do glutaraldeído.

Kawaguti et al. (2006) relataram a influência dos agentes polietilenoimina e glutaraldeído na retenção das células de *Erwinia* sp. D12 em gel de alginato de cálcio para a conversão da sacarose em isomaltulose. Os autores observaram que apenas o glutaraldeído apresentava efeito positivo no processo, sendo encontrada a sua concentração ótima. Valores superiores ou inferiores que o ótimo (0,06%) de glutaraldeído diminuíram bruscamente a atividade. Todavia, a polietilenoimina foi totalmente desinteressante para o processo, indicando que a melhor conversão era obtida quando este agente não era adicionado.

Mundra et al. (2007) otimizaram a imobilização em alginato de cálcio das células de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 para a produção de isomaltulose, sendo as variáveis independentes a concentração da solução polimérica, diâmetro das cápsulas e concentração celular, observando que todas as variáveis foram estatisticamente significativas, e o rendimento do processo aumentado em 40%.

Para o segundo delineamento composto central rotacional 2^2 , as variáveis independentes foram pH e a quantidade de enzima e a variável dependente a porcentagem de conversão da sacarose em isomaltulose. Os níveis estudados, com valores decodificados das variáveis se encontram na Tabela 27 e o planejamento ilustrado na Tabela 28. Nesta etapa foi realizada apenas uma batelada de duas horas e trinta minutos em que foi aplicado 10 g de enzima imobilizada e 50 mL de solução 10% de sacarose a 33°C. Nestes experimentos não foram consideradas as condições ótimas de reação, como temperatura, pH e concentração da sacarose que foram avaliadas posteriormente.

A Tabela 28 mostra que o maior valor de conversão (64,46%) foi obtido no ensaio 3 que corresponde a batelada de pH igual a 4,2 e quantidade de enzima de 2155 U. Todavia, o menor valor de conversão encontrado (32,76%) foi o ocorrido no ensaio 2, uma vez que nesse ponto o valor de pH era maior (5,3) e quantidade de enzima menor (659 U).

Tabela 27. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^2 para o estudo da influência do pH e da quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite tratadas com 0,1% de glutaraldeído

Variáveis	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	4,	4,2	4,7	5,3	5,5
Enzima (U)	352	659	1407	2155	2462

Tabela 28. Delineamento composto central rotacional 2^2 codificado para o estudo da influência do pH e da quantidade da enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

Ensaio*	Variável		Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
	pH	Enzima (U)					
1	-1	-1	1,95	0,802	23,74	18,75	54,76
2	+1	-1	1,25	ND	17,28	48,81	32,76
3	-1	1	3,15	3,00	27,52	1,88	64,46
4	+1	1	2,10	0,91	25,61	18,35	53,02
5	-1,41	0	3,43	1,56	21,69	10,43	62,89
6	+1,41	0	1,68	ND	20,96	35,27	42,09
7	0	-1,41	1,82	ND	20,39	34,87	42,91
8	0	+1,41	2,41	0,95	28,31	6,57	61,78
9	0	0	2,22	1,78	25,31	14,72	55,97
10	0	0	2,21	0,96	23,25	17,33	56,25
11	0	0	2,12	ND	17,33	17,18	56,05

*Todas as preparações foram tratadas com 0,1% de glutaraldeído
 ND – Não detectada

Os resultados dos coeficientes de regressão ilustrados na Tabela 29 indicam que os termos lineares e quadráticos de todas as variáveis independentes, bem como as interações entre elas foram estatisticamente significativas, em intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A análise de variância (Tabela 30) foi realizada para verificar a adequação do modelo (Equação 9) e indicou através do teste F, que este é válido para a predição das respostas em qualquer condição de pH e quantidade de enzima dentro da faixa estudada. Finalmente, o R^2 obtido indica que o modelo em questão é capaz de prever uma porcentagem alta das respostas obtidas no processo (99,39%).

Tabela 29. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

	Coeficiente	Erro Padrão	t(6)	p
	de			
	regressão			
Média*	56,09	0,62	89,80	< 0,0001
(1)pH (L)*	-7,87	0,38	-20,54	< 0,0001
pH (Q)*	-2,10	0,46	-4,59	0,0059
(2)Enzima (L)*	7,09	0,38	18,51	< 0,0001
Enzima (Q)*	-2,17	0,46	-4,75	0,0050
1L by 2L*	2,64	0,54	4,88	0,0045

*parâmetros estatisticamente significativos a 95% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Isomaltulose (%) = $56,09 - 7,87 \cdot \text{pH} - 2,1 \cdot \text{pH}^2 + 7,09 \cdot \text{Enzima} - 2,17 \cdot \text{Enzima} + 2,64 \cdot \text{pH} \cdot \text{Enzima}$ (Equação 9)

Tabela 30. Análise de variância no estudo da influência do pH e quantidade de enzima na imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	962,65	5	192,53	164,47
Resíduos	5,85	5	1,17	
Falta de Ajuste	5,81	3		
Erro Puro	0,04	2		
Total	968,51	10		

R^2 0,9939

$F_{0,95;5;5} = 5,05$

A Figura 9 ilustra que a conversão máxima de sacarose em isomaltulose predita pelo modelo (63,44%) foi obtida utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na faixa de 1700-2263 U, e quando o pH do tampão em que a enzima foi adsorvida no suporte (processo de imobilização) foi igual a 4,0. Deve ser observado que a porcentagem isomaltulose formada, nunca é igual a 100%, pois outros açúcares são formados como a trealulose, glicose e frutose.

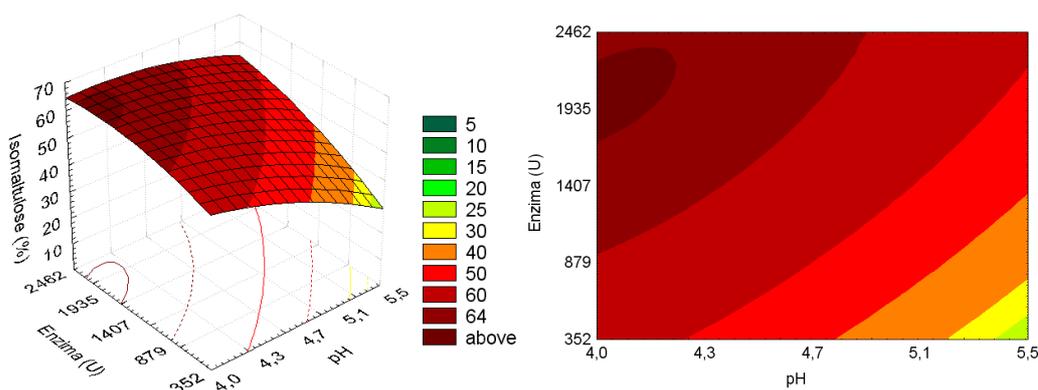


Figura 9. Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH e quantidade de enzima no processo de imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite

4.5.1.2 Otimização das condições de conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

As condições de reação para a conversão da sacarose em isomaltulose pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite nas condições ótimas descritas no item anterior, foram otimizadas como descrito no item 3.7.1.2. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2³, sendo as variáveis independentes pH, a temperatura e concentração do substrato sacarose e a variável dependente a porcentagem de conversão da sacarose em isomaltulose. Os níveis estudados, com valores decodificados das variáveis se encontram na Tabela 31 e o planejamento ilustrado na Tabela 32. Amostras de 10 g de enzima imobilizada nas condições ótimas foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de solução de sacarose, sendo a conversão determinada após duas horas e trinta minutos de reação.

Os resultados de conversão da sacarose em isomaltulose estão ilustrados na Tabela 32, observando-se que o ensaio 9 (pH de 4,5, temperatura de 35°C e concentração de sacarose igual a 17,5%) resultou no menor valor de conversão (9,45%), enquanto que o ensaio 12 (pH de 6,3, temperatura de 52°C e concentração de substrato igual 17,5%) resultou em aproximadamente 65%, sendo o maior valor de conversão observado. Todavia deve-se acrescentar que apesar do ensaio em questão apresentar a maior conversão de sacarose em isomaltulose, não foi observado todo o consumo de sacarose, enquanto que nos ensaios dos pontos centrais (pH igual a 6,5, temperatura de 35°C e concentração de sacarose igual a 17,5%), toda a sacarose foi consumida, resultando em conversão máxima de 63%. Isso é um indicativo que a temperatura influencia fortemente nos produtos formados pela ação da enzima, indicando que em temperaturas menores ocorre maior formação de trealulose em relação aos maiores valores de temperatura. Foi observado também que em pH 5,2 ocorreu menor formação de trealulose do que em pH igual a 7,3. Com a maior formação de trealulose, a conversão de sacarose em isomaltulose é diminuída. Resultados

similares foram observados por Zhang et al. (2002) indicando que a temperatura de reação influencia a proporção dos carboidratos formados pela ação da isomaltulose sintase da linhagem *Klebsiella* sp. LX3, clonada em *Escherichia coli*. Os autores observaram que em temperaturas maiores como 50°C a enzima diminuía a formação de trealulose em quase três vezes quando comparado com a reação estudada a 25°C.

Tabela 31. Valores decodificados utilizados no delineamento composto central rotacional 2^3 para o estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

Variáveis	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	4,5	5,2	6,3	7,3	8,0
Temperatura (°C)	18	25	35	45	52
Sacarose (%)	5,0	10,0	17,5	25,0	30,0

Observa-se na Tabela 33 os valores de coeficiente de regressão, sendo as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,1$) a 90% de confiança o termo quadrático do pH e o termo linear e quadrático da temperatura. Dever-se ressaltar que apesar da Tabela 33 indicar que o valor de p do termo linear da variável temperatura é maior que 0,1, esse parâmetro foi considerado como estatisticamente significativo, após desconsiderar o termo linear da variável pH e todas as interações das variáveis. A concentração do substrato (sacarose) não foi estatisticamente significativa, o que indica que pode ser utilizada qualquer concentração do substrato (na faixa estudada). O modelo matemático do processo está ilustrado na Equação 10.

Tabela 32. Delineamento composto central rotacional 2³ codificado para o estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

Ensaio	Variável			Glicose (%)	Frutose (%)	Trealulose (%)	Sacarose (%)	Isomaltulose (%)
	pH	Temperatura (°C)	Sacarose (%)					
1	-1	-1	-1	1,57	ND	18,56	48,22	31,65
2	+1	-1	-1	2,18	ND	32,38	34,32	31,12
3	-1	+1	-1	2,73	1,28	7,96	56,87	31,16
4	+1	+1	-1	2,78	ND	15,79	46,87	34,58
5	-1	-1	+1	1,31	ND	14,23	60,35	24,12
6	+1	-1	+1	1,85	ND	29,15	40,65	28,35
7	-1	+1	+1	3,19	2,27	9,38	49,16	36,00
8	+1	+1	+1	2,61	0,96	14,25	49,21	32,97
9	-1,68	0	0	1,94	1,01	2,75	84,85	9,45
10	+1,68	0	0	3,60	0,87	26,18	31,04	38,31
11	0	-1,68	0	1,16	ND	36,07	27,04	35,64
12	0	+1,68	0	5,53	3,57	15,38	10,52	64,99
13	0	0	-1,68	2,83	1,42	36,45	ND	59,30
14	0	0	+1,68	2,74	1,45	28,96	4,34	62,51
15	0	0	0	2,95	1,84	32,54	0,55	62,13
16	0	0	0	2,85	1,96	31,43	0,65	63,11
17	0	0	0	2,95	1,93	32,76	ND	62,36

ND – Não detectada

A ANOVA (Tabela 34) indica que o modelo foi validado pelo teste F, sendo que o valor de F calculado foi maior que o F tabelado. O valor de R² obtido foi 0,7322, indicando que o modelo é capaz de prever 73,22% das respostas obtidas no processo.

Tabela 33. Resultados dos coeficientes de regressão no estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

	Coefficiente	Erro Padrão	t(7)	p
	de			
	regressão			
Média*	63,38	6,48	9,77	< 0,0001
(1)pH (L)	3,85	3,04	1,26	0,2464
pH (Q)*	-16,53	3,36	-4,92	0,0017
(2)Temperatura(L)*	5,04	3,04	1,65	0,1419
Temperatura(Q)*	-7,16	3,36	-2,13	0,0703
(3)Sacarose(L)	-0,12	3,04	-0,04	0,9689
Sacarose(Q)	-3,41	3,37	-1,01	0,3437
1L by 2L	-0,41	3,98	-0,10	0,9200
1L by 3L	-0,21	3,98	-0,05	0,9591
2L by 3L	1,69	3,98	0,42	0,6835

*parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança

(L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático

Isomaltulose (%) = 59,03 – 15,52.pH + 5,04.Temperatura – 6,15.Temperatura²
(Equação 10)

Tabela 34. Análise de variância no estudo da influência do pH e temperatura de reação e concentração de substrato na conversão da sacarose em isomaltulose catalisada pela glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	3402,27	3	1134,09	11,85
Resíduos	1244,48	13	95,73	
Falta de Ajuste	1243,96	11		
Erro Puro	0,52	2		
Total	4646,76	16		

R^2 0,7322
 $F_{0,95;3;13} = 2,56$

A superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 10) ilustram o comportamento da enzima em diferentes valores de pH e temperatura, quando a concentração de sacarose foi fixada em 30%. Observa-se que quando a reação é realizada tanto na temperatura quanto nos valores de pH próximos às regiões centrais se obtém alta atividade. Através do modelo matemático pode-se obter os valores ótimos de pH e temperatura de reação que foram respectivamente de 6,0 a 6,5 e 35 a 40°C, sendo a concentração de substrato definida em 30%. O perfil bioquímico da glicosiltransferase imobilizada em Celite foi similar ao da enzima bruta na sua forma solúvel, (item 4.3.2, Figura 6a), indicando que o processo de imobilização não interfere no desempenho da enzima, porém o valor de temperatura ótima foi levemente alterado em relação à glicosiltransferase bruta livre.

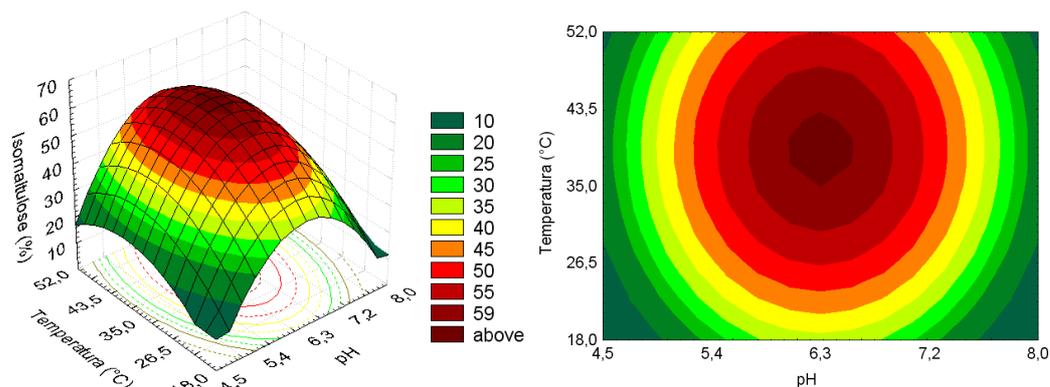


Figura 10. Superfície de resposta e curva de contorno para a conversão da sacarose em isomaltulose em função do pH e da temperatura de reação utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite e concentração de sacarose de 30%

4.5.1.3 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite

4.5.1.3.1 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada

O estudo da conversão da sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite com e sem o tratamento com glutaraldeído, em processo de batelada, foi realizado de acordo com item 3.7.1.3.1. A temperatura de conversão utilizada foi de 22°C, logo não sendo utilizada a faixa ótima (35-40°C), uma vez que como estudado anteriormente, a enzima apresenta-se instável nesta faixa de temperatura.

Como pode ser observado na Figura 11, a glicosiltransferase imobilizada em Celite sem tratamento com glutaraldeído resultou em conversão da sacarose em isomaltulose, em cerca de 49%, na primeira batelada, a partir de solução 30% de sacarose. O tratamento da enzima imobilizada em Celite com glutaraldeído não foi interessante para o processo, pois além de não aumentar a retenção da enzima no suporte resultou em um menor valor de conversão da sacarose em isomaltulose que a enzima imobilizada sem tratamento. Observou-se nas duas

preparações que houve diminuição do grau de conversão em 50% na segunda batelada, chegando a valores desconsideráveis a partir da quinta batelada. Esses resultados foram diferentes dos encontrados no item 4.5.1.1, que indicava que o tratamento da preparação com glutaraldeído aumentava a retenção da glicosiltransferase bruta na Celite. Possivelmente isso ocorreu, pois o período de reação das bateladas no item anterior (duas horas e trinta minutos) não foi suficiente para se observar a não eficiência do glutaraldeído no processo.

Mansour e Dawoud (2003) estudaram a imobilização da invertase de *Saccharomyces cerevisiae* por adsorção em Celite e poliacrilamida, observando que as enzimas imobilizadas apresentaram boa estabilidade operacional podendo ser reutilizadas por até 20 ciclos de 30 minutos sem considerável perda da atividade enzimática.

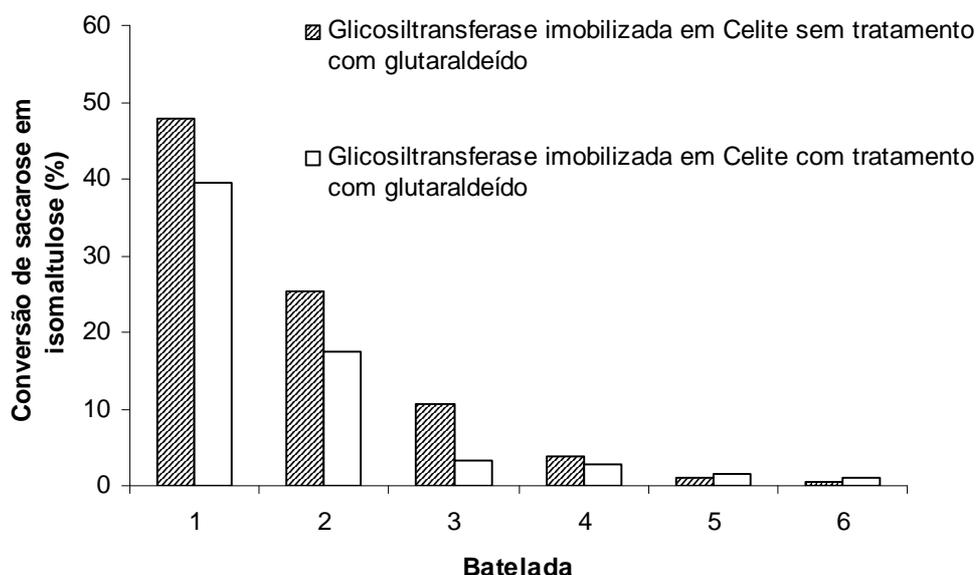


Figura 11. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite com e sem tratamento com glutaraldeído, em processo de batelada

4.5.1.3.2 Aplicação da glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leito empacotado

O estudo da conversão da sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada Celite, em coluna de leito empacotado, foi realizado como descrito no item 3.7.1.3.2.

O processo utilizando coluna de leito empacotado apresentou cerca de 50% de conversão de sacarose em isomaltulose para as duas preparações com e sem tratamento com glutaraldeído, em uma hora de processo. Entretanto, após a segunda hora de reação a taxa de conversão diminuiu rapidamente apresentando a metade da capacidade de conversão observada na primeira hora (Figura 12). A partir de oito horas, a conversão da sacarose em isomaltulose foi inferior a 10%. O tratamento da glicosiltransferase imobilizada em Celite, com 0,1% de glutaraldeído não resultou em aumento da estabilidade da enzima. Após 24 horas de adição contínua de solução 30% de sacarose na coluna de glicosiltransferase imobilizada em Celite tratadas com 0,1% de glutaraldeído e não tratada com glutaraldeído foram obtidos, respectivamente, cerca de 4,98% e 6,58% de isomaltulose.

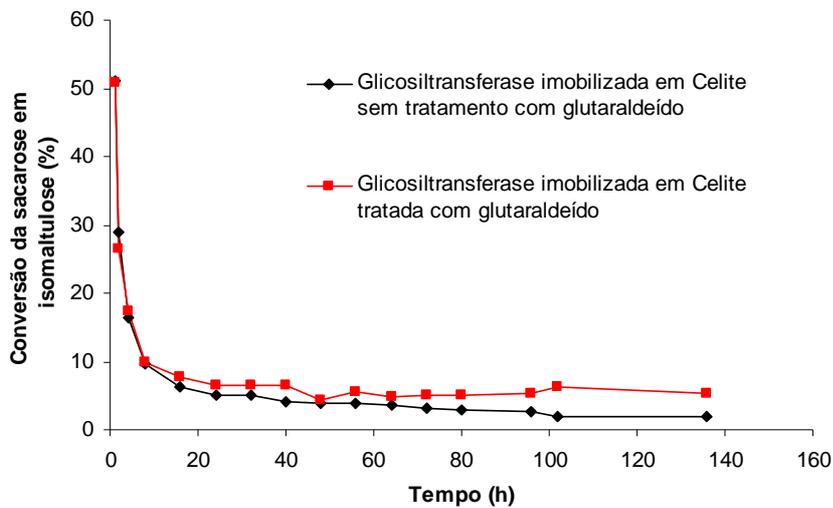


Figura 12. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite com e sem tratamento com glutaraldeído, em coluna de leito empacotado

4.5.2 Imobilização da glicosiltransferase bruta em gel de pectina BTM

4.5.2.1 Caracterização físico-química das microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM com e sem a adição de gordura

A glicosiltransferase bruta foi imobilizada em gel de pectina BTM como descrito no item 3.7.2 e caracterizada como no item 3.7.2.1. Pode ser observado na Tabela 35 que as microcápsulas contendo a glicosiltransferase com e sem a adição de gordura apresentaram algumas propriedades físico-químicas diferentes. Enquanto as microcápsulas sem adição de gordura apresentaram porcentagem de umidade igual a 97,8% e proteínas igual a 1,8% em massa seca, as cápsulas com a adição de gordura apresentaram maior eficiência de encapsulação, o que indica que a presença do material lipofílico, durante o processo de cura foi eficiente na retenção das proteínas totais. Em estudo realizado por Bourgeois et al. (2006) foi

relatado que a eficiência de encapsulação do processo de imobilização β -lactamase foi igual a 75% quando preparadas com pectina amidada e 45% quando usado pectina não amidada.

Tabela 35. Caracterização físico-química das microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM com e sem a adição de gordura

	Umidade (% m/m)	Proteínas (% m/m)	E.E. %
Microcápsulas sem gordura	97,8	1,8	52,4
Microcápsulas com gordura	95,6	1,0	58,2

4.5.2.2 Análises microscópicas

As análises das microcápsulas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas como descrito no item 3.7.2.3. As Figuras 14 e 15 ilustram respectivamente a distribuição do tamanho das microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM preparadas sem e com a adição de gordura. As microcápsulas sem gorduras apresentaram diâmetro médio igual a 173 μm enquanto que as microcápsulas com adição de gorduras apresentaram diâmetro médio de 196 μm indicando que o acréscimo de gordura resultou em microcápsulas um pouco maiores devido ao confinamento do material gorduroso. As micrografias obtidas por microscopia óptica estão ilustradas nas Figuras 15-18. Pode-se observar que em todos os experimentos as microcápsulas apresentaram a forma esférica e multinucleada, sendo observados grânulos de gordura nas microcápsulas preparadas com mistura de material lipofílico (Figura 16). As Figuras 17 e 18 ilustram as microcápsulas após seis bateladas de conversão da solução de sacarose em isomaltulose, indicando que os dois tipos de microcápsulas apresentaram estruturas íntegras, não sendo observada

alteração das cápsulas. As Figuras 19 e 20 ilustram respectivamente as estruturas das microcápsulas de gel de pectinas BTM contendo glicosiltransferase preparadas sem e com adição de gordura, liofilizadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que as microcápsulas preparadas sem adição de gordura apresentavam-se mais quebradiças do que aquelas contendo gordura.

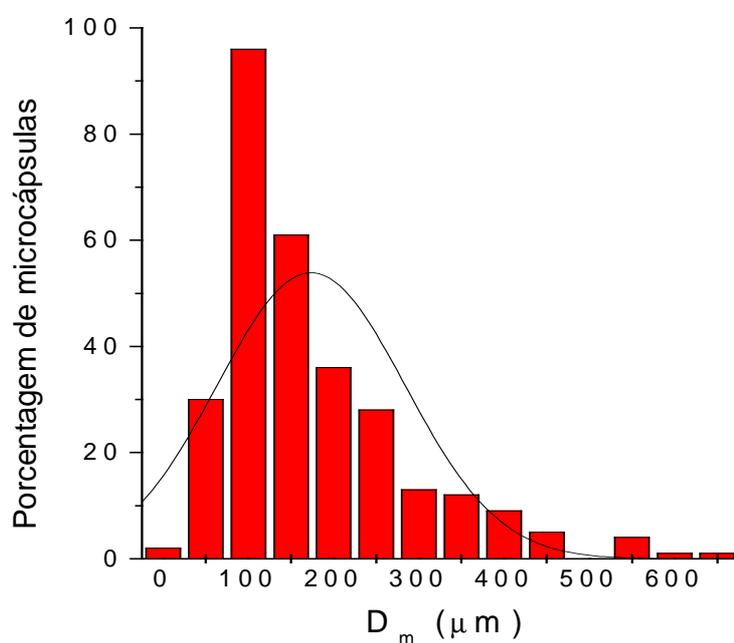


Figura 13. Distribuição do tamanho das microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase sem adição de 2% de gordura

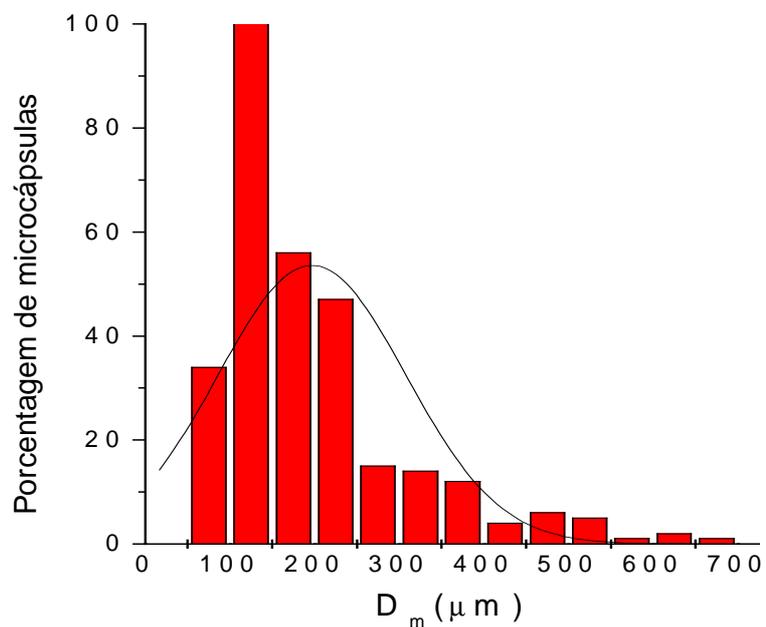


Figura 14. Distribuição do tamanho das microcápsulas de gel de pectina BTM contendo a glicosiltransferase com adição de 2% de gordura

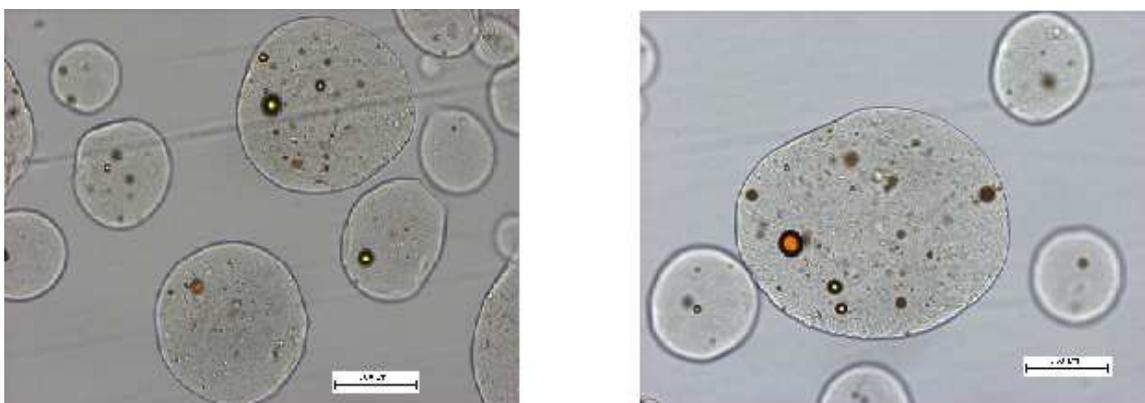


Figura 15. Microcápsulas de gel de pectina BTM recém preparadas, contendo glicosiltransferase sem adição de gordura. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)

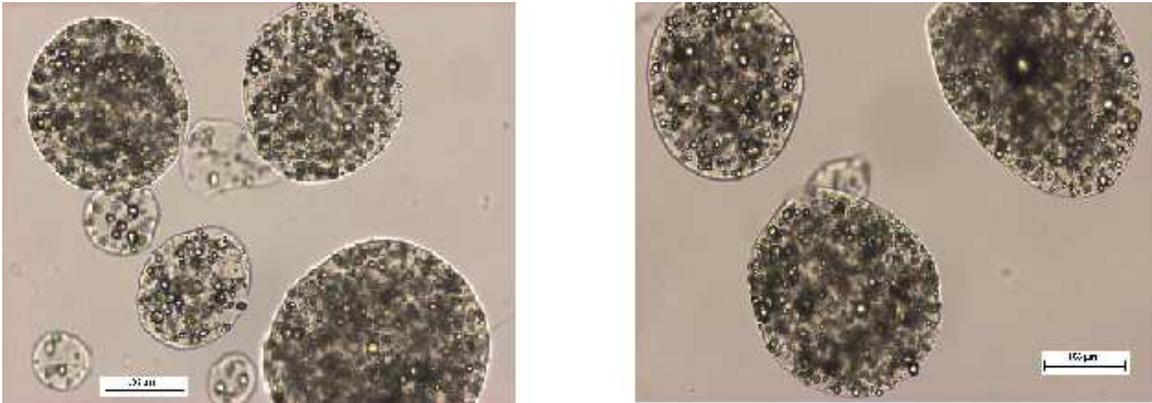


Figura 16. Microcápsulas de gel de pectina BTM recém preparadas, contendo glicosiltransferase com adição de gordura. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)

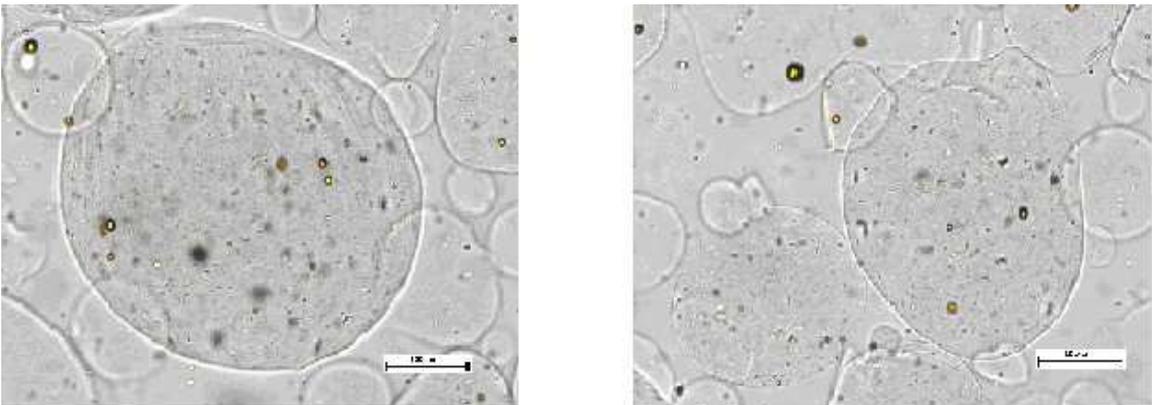


Figura 17. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas sem adição de gordura, após serem utilizadas em seis bateladas de 30 minutos de conversão de sacarose em isomaltulose. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)

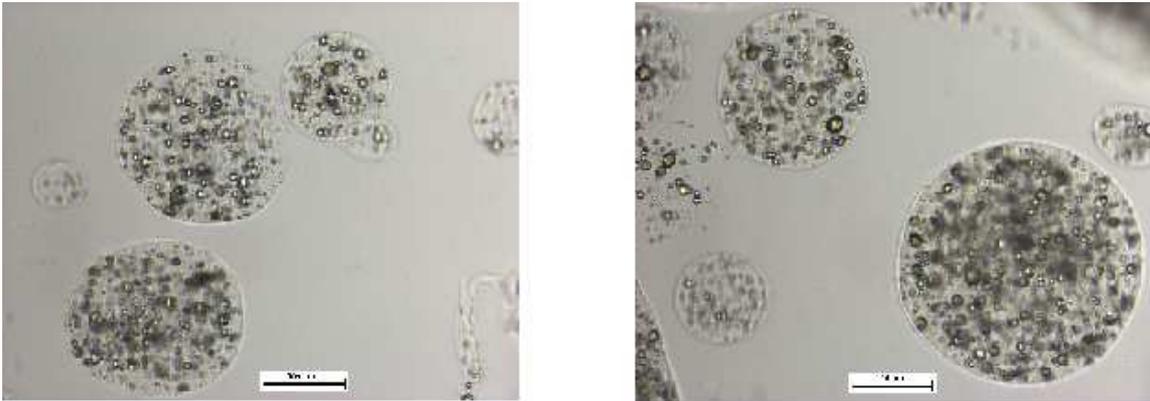


Figura 18. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas com adição de gordura, após serem utilizadas em seis bateladas de 30 minutos de conversão de sacarose em isomaltulose. Microscopia óptica (objetiva com aumento de 10 vezes)

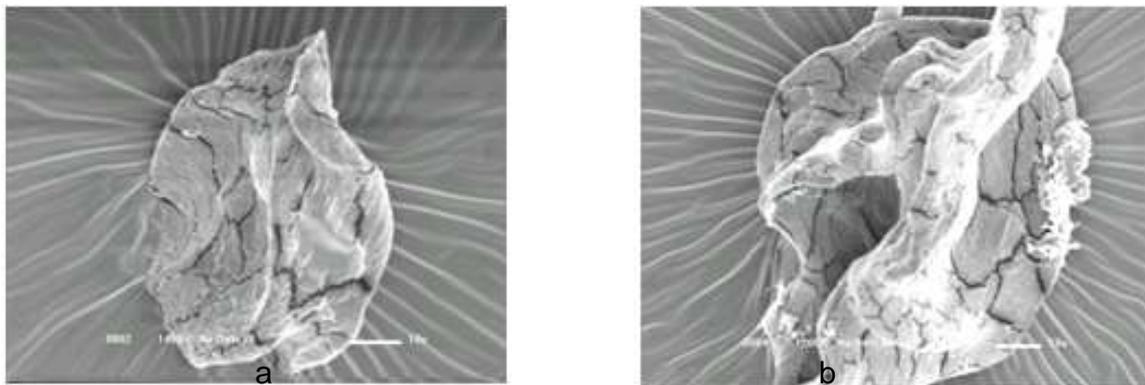


Figura 19. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas sem adição de gordura e liofilizadas. Microscopia eletrônica de varredura (a - aumento de 1400 vezes; b – aumento de 1200 vezes)

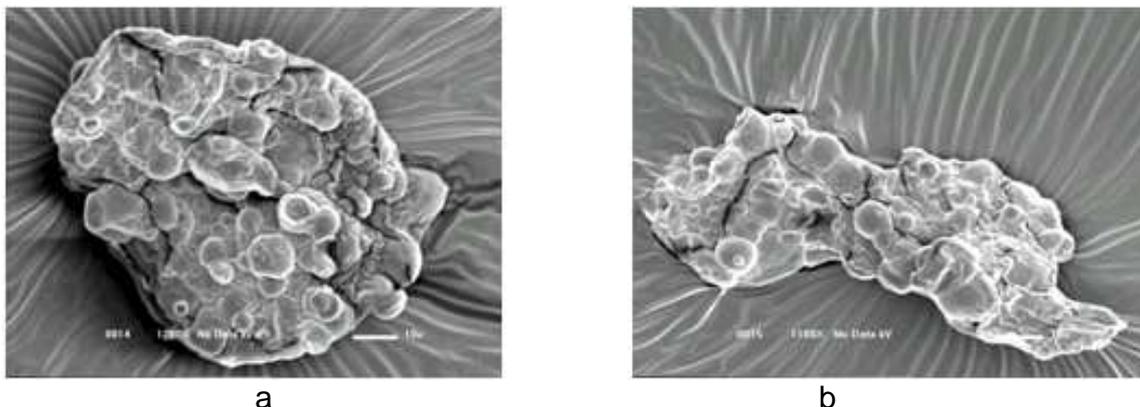


Figura 20. Microcápsulas de gel de pectina BTM contendo glicosiltransferase preparadas com adição de gordura e liofilizadas. Microscopia eletrônica de varredura (a - aumento de 1200 vezes; b – aumento de 1100 vezes)

4.5.2.3 Retenção da atividade enzimática de glicosiltransferase nas microcápsulas de gel de pectina BTM

A determinação da atividade da glicosiltransferase imobilizada em microcápsulas de gel de pectina BTM foi determinada como descrito no item 3.7.2.4. A Figura 21 ilustra que as microcápsulas com adição de gordura mantiveram cerca de 70% e 100% da atividade de glicosiltransferase nas três primeiras bateladas. Na quarta e sexta batelada a atividade relativa diminuiu para cerca de 20% e 12% respectivamente.

As microcápsulas de glicosiltransferase imobilizadas em gel de pectina BTM preparadas sem a adição de gordura, microcápsulas com adição de gordura e liofilizadas e as microcápsulas sem adição de gordura e liofilizadas apresentaram baixa atividade enzimática na primeira batelada.

Desta forma, as microcápsulas de glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM com adição de 2% gordura (50% de ácido oléico e 50% de manteiga) foram selecionadas para o estudo de conversão da sacarose em isomaltulose.

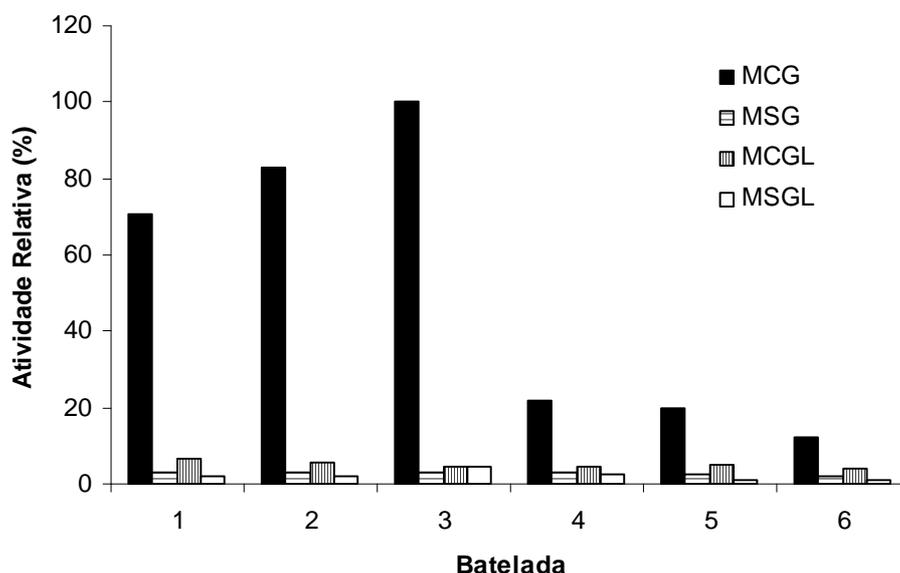


Figura 21. Atividade enzimática relativa das diferentes microcápsulas de glicosiltransferase immobilizadas em gel de pectina BTM após seis bateladas de 30 minutos

MCG – Microcápsulas com gordura; MSG – Microcápsulas sem gordura; MCGL – Microcápsulas com gordura liofilizada; MSGL – Microcápsulas sem gordura liofilizada.

4.5.2.4 Aplicação da glicosiltransferase bruta immobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura

4.5.2.4.1 Aplicação da glicosiltransferase bruta immobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em processo de batelada

O estudo da conversão da sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta immobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura em processo de batelada foi realizado de acordo com item 3.7.2.5.1.

A Figura 22 ilustra os resultados de conversão da sacarose em isomaltulose, indicando que inicialmente a enzima immobilizada apresentou

conversão de cerca de 29%, todavia a atividade enzimática foi diminuída com o decorrer das demais bateladas, resultando em cerca de 25% na segunda batelada, sendo o valores de conversão inferiores a 5% a partir da décima batelada.

Bhushan et al. (2008) estudaram a imobilização da lipase de *Arthrobacter* sp. em alginato de cálcio avaliando parâmetros de imobilização, como concentração de cloreto de cálcio, quantidade de enzima e tamanho do gel. Os autores observaram que a enzima imobilizada pode ser reutilizada por até 10 ciclos de 1 hora sem perda significativa da atividade.

Kawaguti et al. (2007) estudaram a imobilização de três diferentes preparações contendo a glicosiltransferase que converte sacarose em isomaltulose produzidas pela *Erwinia* sp. D12. Estas foram células íntegras, células rompidas contendo a enzima e a enzima extraída das células. Neste trabalho os autores imobilizaram as preparações em 2% de alginato de cálcio tratados com 0,06% de glutaraldeído e aplicaram em bateladas de 24 horas na conversão da sacarose em isomaltulose a partir de solução 35% de sacarose. As células íntegras imobilizadas apresentaram maior valor de conversão na primeira batelada (64,6%), sendo esses valores próximos aos valores obtidos com as células lisadas (62,6%). Todavia, a enzima extraída imobilizada em alginato apresentou, na primeira batelada, conversão de 43,1%. Nas posteriores bateladas, a capacidade de conversão da sacarose em isomaltulose das preparações decaiu significativamente chegando a cerca de 8% na segunda batelada em todas as três preparações. A partir da quarta batelada apenas a enzima extraída e imobilizada apresentava capacidade de converter a sacarose em isomaltulose em cerca de 5%.

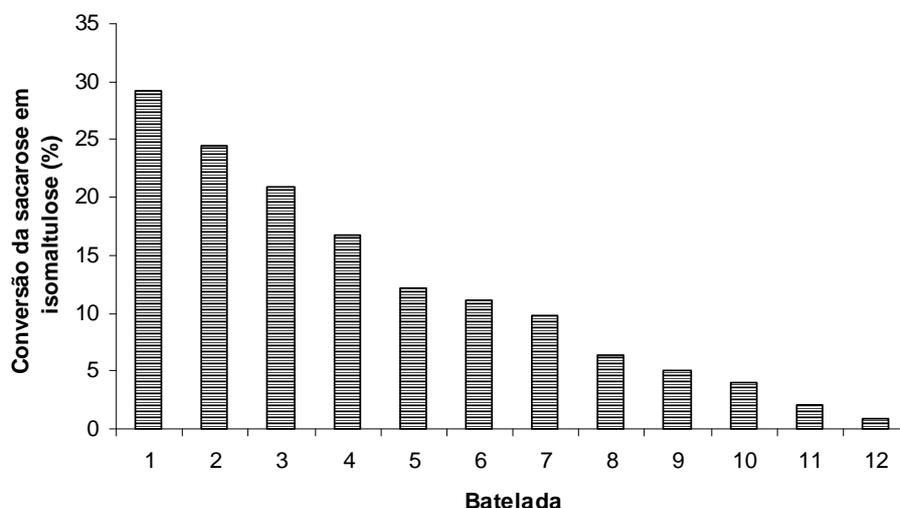


Figura 22. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura em processo de batelada

4.5.2.4.2 Aplicação da glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, na conversão de sacarose em isomaltulose, em coluna de leite empacotado

O estudo da conversão da sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM em coluna de leite empacotado foi realizado como descrito no item 3.7.2.5.2.

A Figura 23 ilustra que utilizando-se a coluna de leite empacotado contendo glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM preparada com adição de gordura foi obtido conversão máxima de 10,5% de isomaltulose no período de 5 a 8 horas de circulação contínua da solução 10% de sacarose. Após cerca de 15 horas de uso contínuo, a conversão de sacarose diminuiu para cerca de 7,5% sendo que após 40 horas a produção de isomaltulose diminuiu rapidamente. Baixos valores (3%) de isomaltulose foram obtidos após 60 horas de uso contínuo da enzima imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura.

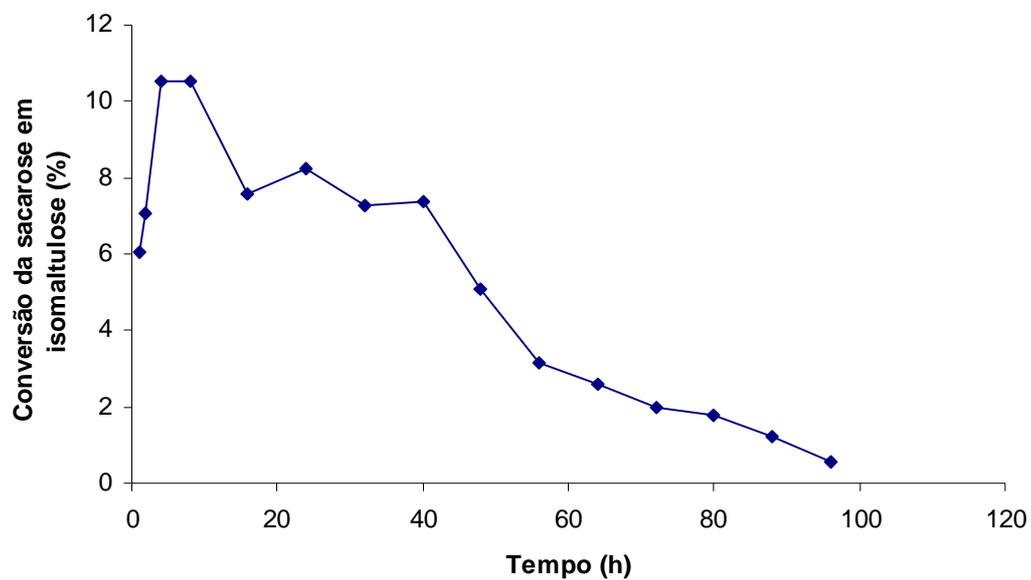


Figura 23. Conversão de sacarose em isomaltulose utilizando-se glicosiltransferase bruta imobilizada em gel de pectina BTM com adição de gordura, em coluna de leite empacotado

5 CONCLUSÕES

- A glicosiltransferase bruta de *Erwinia* sp. D12 apresentou atividade enzimática igual a 23,39 U/mL e foi purificada por cromatografia em coluna de SP-Sepharose Fast Flow, obtendo-se duas frações com atividade de glicosiltransferase. A fração n° 2, ainda impura por SDS-PAGE, não adsorvida na coluna apresentou atividade enzimática igual a 0,49 U/mL. Já a fração n° 17, apresentou atividade de glicosiltransferase igual a 1,55 U/mL, fator de purificação igual a 17,93 e massa molecular de 65 kDA por SDS-PAGE.
- Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ da glicosiltransferase bruta e frações purificadas n° 2 e n° 17 foram respectivamente iguais a 27,41, 1,37 e 2,22 μmol de isomaltulose/minuto/mg de proteína. Os valores de K_m foram 52, 54 e 49 mM de sacarose para a enzima bruta, fração n° 2 e fração n° 17, respectivamente.
- A enzima bruta e as duas frações purificadas apresentaram atividade ótima de glicosiltransferase na faixa de pH de 6,0 a 6,5 e temperatura de 30 a 35°C. A glicosiltransferase bruta apresentou baixa estabilidade térmica e a purificação da enzima tornou-a mais sensível a alterações de pH e temperatura.
- A glicosiltransferase bruta converteu 59,52% da sacarose (solução 10%) em isomaltulose em quatro horas, a 33°C. A glicosiltransferase purificada das frações n° 2 e n° 17 converteram respectivamente 63,78% e 63,04% da sacarose em isomaltulose após 24 horas de reação a 33°C, a partir de solução 10% de sacarose.

- As condições ótimas para a imobilização da glicosiltransferase bruta em Celite foi pH 4,0 para o processo de adsorção usando-se quantidade de enzima na faixa de 1700-2263 U.
- A glicosiltransferase bruta imobilizada em Celite apresentou capacidade ótima de conversão da sacarose em isomaltulose na faixa de pH entre 6,0 e 6,5 e temperatura de 35 a 40°C, resultando em uma porcentagem de isomaltulose formada superior a 60%, quando utilizado uma solução de sacarose 30%.
- A glicosiltransferase imobilizada em Celite converteu cerca de 49% da solução 30% de sacarose em isomaltulose na primeira batelada. As duas preparações com e sem tratamento com glutaraldeído apresentaram diminuição rápida na capacidade de formação da isomaltulose nas bateladas posteriores. Em coluna de leito empacotado a glicosiltransferase imobilizada em Celite apresentou conversão inicial de cerca de 50% da sacarose em 1 hora, mas com rápida queda chegando a cerca de 5% em 24 horas.
- As microcápsulas de pectina BTM contendo a glicosiltransferase com e sem adição de gordura apresentaram propriedades físico-químicas diferentes entre si, sendo que as microcápsulas sem gordura apresentaram maior concentração de proteínas, porém menor eficiência de encapsulação que as preparações com adição de gordura.
- As microcápsulas de glicosiltransferase imobilizada em gel de pectina BTM sem gordura apresentaram tamanho médio igual a 173 μm e as microcápsulas de enzima imobilizada com gordura 196 μm , forma esférica e multinucleada. Na análise de microscopia eletrônica de varredura as microcápsulas contendo glicosiltransferase no qual não foi adicionado

gordura apresentaram-se mais quebradiças que as microcápsulas com gordura.

- As microcápsulas de glicosiltransferase immobilizada em gel de pectina BTM com a adição de gordura apresentaram retenção da atividade enzimática, mantendo-a por três bateladas de trinta minutos, sem perda considerável. As microcápsulas não liofilizadas sem adição de gordura, e as microcápsulas liofilizadas com e sem a adição de gordura apresentaram baixa atividade de glicosiltransferase. A adição de gordura contribuiu para a manutenção da atividade de glicosiltransferase e a liofilização das microcápsulas de enzima immobilizada resultou em perda da atividade enzimática.
- Na conversão de solução 10% de sacarose em isomaltulose, as microcápsulas de glicosiltransferase não liofilizadas immobilizadas em gel de pectina BTM com adição de gordura converteram 30% da sacarose em isomaltulose na primeira batelada de 8 horas, diminuindo gradativamente com as posteriores bateladas. Em coluna de leito empacotado, a conversão máxima de sacarose em isomaltulose foi igual a 10,5% em 2 horas, sendo que após 60 horas foi igual a 3%.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificação da glicosiltransferase bruta utilizando uma coluna maior para obtenção de maior quantidade da enzima purificada.
- Estudo de outros suportes para imobilização da glicosiltransferase ou das células, como resinas de troca iônica e polímeros sintéticos visando sua aplicação na conversão da sacarose em isomaltulose, bem como o aumento da estabilidade da enzima.
- Estudo dos suportes Celite e gel pectina BTM para a imobilização de outras enzimas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHTEN, J.; JENTJENS, R.L.; BROUNS, F.; JEUKENDRUP, A.E. Exogenous oxidation of isomaltulose is lower than that of sucrose during exercise in men. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p.1143-1148, 2007.
2. AHN, S-J.; YOO, J-H.; LEE, H-C.; KIM, S-Y.; NOH, B-S.; KIM, J-H.; LEE, J-K. Enhanced conversion of sucrose to isomaltulose by a mutant of *Erwinia rhapontici*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p.1179–1183, 2003.
3. ARAI, H.; MIZUNO, A.; SAKUMA, M.; FUKAYA, M.; MATSUO, K.; MUTOA, K.; SASAKI, H.; MATSURA, M.; OKUMURA, H.; YAMAMOTO, H.; TAKETANI, Y.; DOI, T.; TAKEDA, E. Effects of a palatinose-based liquid diet (Inslow) on glycemic control and the second-meal effect in healthy men. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 56, p.115– 121, 2007.
4. BAER, A. Significance and promotion of sugar substitution for the prevention of dental caries. **Lebensm Wiss Technol**, v. 22, p.46–53, 1989.
5. BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G.N.; GUPTA, V.K. Immobilization of lipase by entrapment in ca-alginate beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, p.552-562, 2008.
6. BOURGEOIS, S.; GERNET, M.; PRADEAU, D.; ANDREMONT, A.; FATTAL, E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p.2-9, 2006.

7. BRACCINI, L.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1089-1096, 2001.
8. CARTARIUS, R.; KRAUSE, T.; AND VOGEL, H. Degradable surfactants via heterogeneously catalyzed reductive amination of isomaltulose – examination of catalyst deactivation in a continuous gradient free reaction vessel. **Chemical Engineering and Technology**, v. 24, p.55A–59A, 2001.
9. CELESTINO, ÉRICA MARCONDES. **Produção, purificação e estudo das características bioquímicas de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12. Produção de isomaltulose a partir de sacarose**. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
10. CHEETHAM, P.S.J.; GARRET, C.; CLARK, J. Isomaltulose production using immobilized cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p.471-481, 1985.
11. CHO, M-H.; PARK, S-E.; LIM, J.K.; KIM, J-S.; KIM J.H.; KWON, D.Y.; PARK, C-S. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.453–458, 2007.
12. CORREA, R.M.; PRATA, A.S.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. **Current Drug Delivery**, v. 1, p.265-273, 2004.
13. DA SILVA, V.C.F.; CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*. a

- comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p.1468-1474, 2008.
14. FUJII, S.; KISHIHARA, S.; KOMOTO, M.; SHIMIZU, J. Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation action of *Serratia plymuthica*. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 30, p.339–344, 1983.
 15. FUJIWARA, T.; NAOMOTO, Y.; MOTOKI, T.; SHIGEMITSU, K.; SHIRAKAWA, Y.; YAMATSUJI, T.; KATAOKA, M.; HAISA, M.; FUJIWARA, T.; EGI, M.; MORIMATSU, H.; HANAZAKI, M.; KATAYAMA, H.; MORITA, K.; MIZUTO, K.; ASOU, T.; ARIMA, H.; SASAKI, H.; MATSUURA, M.; GUNDUZ, M.; TANAKA, N. Effects of a novel palatinose based enteral formula (MHN-01) carbohydrate-adjusted fluid diet in improving the metabolism of carbohydrates and lipids in patients with esophageal cancer complicated by diabetes mellitus. **Journal of Surgical Research**, v. 138, p.231–240, 2007.
 16. GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S.K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase, **Food Chemistry**, v. 97, p.426–430, 2006.
 17. GOLDSCHER, R.L. Process for the manufacture of isomaltitol **US Patent** 5.679.78121, 1997.
 18. GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Leaching studies over immobilized α -amylase. Importance of the nature of enzyme attachment. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 83, n. 1, p.79-83, 2004.

19. HUANG, J.H.; HSU, L.H.; SU, Y-C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p.22-27, 1998.
20. IMESON, A. **Thickening and gelling agents for food**, London: Blackie Academic & professional, 1997. 258 p.
21. IMFELD, T.N. Non-nutritive sweeteners, sugar substitutes, and confectionery products. In: **Identification of low caries risk dietary components**. Karger, Basel, 1983. pp 117–141.
22. IRWIN, W.E.; STRÄTER, P.J. In: **Alternative Sweeteners**; NABORS, L.O.; GELARDI, R.C. (Eds) Marcel Dekker: New York, 1991, cap. 16.
23. IRWIN, W.E. Isomalt - a sweet, reduced-calorie bulking agent. **Food Technology**, v. 44, p.128, 1990.
24. JONKER, D.; LINA, B.A.R.; KOZIANOWSKI, G. 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40 p.1383–1389, 2002.
25. KASHIMURA, J.; KIMURA, M.; KONDO, H.; YOKOI, K.; NISHIO, K.; NAKAJIMA, Y.; ITOKAWA, Y. Effects of feeding of Palatinose and its condensates on tissue mineral. **Nihon Eiyo Shokuryo Gakkaishi**, v. 43, n. 2, p.127-131, 1990.
26. KASHIMURA, J.; NAGAI, Y. Inhibitory effect of palatinose on glucose absorption in inverted rat gut. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, p.87-89, 2007.

27. KASHIMURA, J.; NAGAI, Y.; EBASHI, T.; GODA, T. The effect of palatinose on other sugar's digestions and absorption. **Abstracts of the Japanese Society of Nutrition and Food Science Conference**. Tokyo, 15, p.77, 2005.
28. KAWAGUTI, H.Y.; BUZZATO, M.F.; ORSI, D.C.; SUZUKI, G.T. SATO, H.H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p.2035-2040, 2006.
29. KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36 p.202–208, 2007.
30. KAWAGUTI, HAROLDO YUKIO. **Conversão enzimática da sacarose em isomaltulose**. 166p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
31. KRASTANOV, A.; YOSHIDA, T. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p.593–598, 2003.
32. LI, X.; ZHANG, D.; CHEN, F.; MA, J.; DONG, Y.; ZHANG, L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.2131–2136, 2004.

33. LINA, B.A.R. JONKER, D.; KOZIANOWSKI, G. Isomaltulose (Palatinose®): A review of biological and toxicological studies. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 40, n. 10, p.1375-1381, 2002.
34. LINA, B.R.; PROOIJJE, A.E.S-V.; WAALKENS-BERENDSEN, D-H. Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3-4, p.309-314, 1997.
35. LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemical Society**, v. 56, p.658-666, 1934.
36. MACDONALD, I.; DANIEL, J.W.; The bio-availability of isomaltulose in man and rat. **Nutrition Reports International**, v. 28, p.1083– 1090, 1983.
37. MANSOUR, E.H.; DAWOUD, F.M. Immobilization of invertase on Celite and on polyacrylamide by an absorption procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p.446–450, 2003.
38. MARKOSYAN, A.A.; ABELYAN, L.A.; ADAMYAN, M.O.; EKAZHEV, Z.D.; AKOPYAN, Z.H.I.; ABELYAN, V.A. Production of fructooligosaccharide syrup from sucrose in combination with palatinose and trehalose. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 4, p.383–389. 2007.
39. MATSUKUBO, T.; TAKAZOE, I.; Sucrose substitutes and their role in caries prevention. **International Dental Journal**, v. 56, p.119–130, 2006.
40. MCALLISTER, C.T.; KELLY, C.T.; DOYLE, E.; FOGASRTY, W.M. The isomaltulose synthesing enzyme of *Serratia plymuthica*. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 9, p.667-672, 1990.

41. MUNDRA, P.; DESAI, K.; LELE, S.S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose. **Bioresource Technology**, v. 98, p.2892–2896, 2007.
42. NDINDAYINO, F.; HENRIST, D.; KIEKENS, F.; VERVAET, C.; REMON, J. P. Characterization and evaluation of isomalt (Palatinit[®]) performance in direct compression. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 189, p.113-124, 1999.
43. OLIVEIRA, A.C.; ROSA, M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 16, n. 6, p.349-353, 1997.
44. PARK, Y.K.; UEKANE, R.T.; PUPIN, A.M. Conversion of sucrose to isomaltulose by microbial glucosyltransferase. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 7, p.547-551, 1992.
45. PARK, Y.K.; UEKANE, R.T.; SATO, H.H. Biochemical characterization of microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 27, p.131-136, 1996.
46. PONCELET, D. Encapsulation of enzymes: Potentiality and applications. XIVth International Workshop on Bioencapsulation, Lausanne, CH. p. O8-1, 2006.
47. RAVAUD, S.; WATZLAWICK, H.; HAZER, R.; MATTES, R.; AGHAJARI, N. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from

- Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. **Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications**, F61, p.100-103, 2005.
48. RAVAUD, S.; WATZLAWICK, HAZER, R.; MATTES, R.; AGHAJARI, N. Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. **Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications**, F62, p.74–76, 2006.
49. SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. **Food Chemistry**, v. 94, p.573–579, 2006.
50. SASAKI, N.; TOPITSOGLOU, V.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Cariogenicity of isomaltulose (palatinose), sucrose and mixture of these sugars in rats infected with *Streptococcus mutans* E-49. **Swedish Dental Journal**, v. 9, p.149–155, 1985.
51. SATO, K.; ARAI, H.; MIZUNO, A.; FUKAYA, M.; SATO, T.; KOGANEI, M.; SASAKI, H.; YAMAMOTO, H.; TAKETANI, Y.; DOI, T.; TAKEDA, E. Dietary palatinose and oleic acid ameliorate disorders of glucose and lipid metabolism in Zucker fatty rats. **The Journal of Nutrition and Disease**, v. 137, n. 8, p.1908-1915, 2007.
52. SCHIWECK, H.; MUNIR, M.; RAPP, K.M.; SCHNEIDER, B.; VOGEL, M. New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In: LICHTENTHALER F.W. (Ed.) **Carbohydrates as Organic Raw Materials**. Weinheim: Wiley-VCH, 1991. p. 57–94.

53. SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glucosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. **GB Patent** 2.082.591, 1982.
54. SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, N. M.; KLENK, NM. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p.76-85, 1985.
55. SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, n. 1, p.61-68, 1945.
56. STODOLA, F.H.; SHARP, E.S.; KOEPEL, H.J.; The preparation, properties and structure of the disaccharide leucrose. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p.2514–2518, 1956.
57. STRÄTER, P.J. In: NABORS, L.O.; GEKARDI, R.C. (Eds.) **Alternative Sweeteners**. Marcel Dekker: New York, 1986. pp. 217-244.
58. TAKAZOE, I. Palatinose- An isomeric alternative to sucrose. In: **Progress in Sweeteners**, GRENBY, T.H. 1989, pp. 143-167
59. THAKUR, B.; SINGH, R.; HANDA, A. Chemistry and uses of pectin, a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 37, p.47-73, 1997.
60. UEKANE, REGINA TOMIE. **Caracterização bioquímica de glicosiltransferase de *Klebsiella* sp. e produção de isomaltulose a partir de sacarose**. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)

– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

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. WU, L.; BIRCH, R.G. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.93–103, 2004.
63. WU, L.; BIRCH, R.G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3 p.1581–1590, 2005.
64. YUN, J.W.; OH, K.K.; KIM, J.H.; JEON, Y.J.; LEE, J.H.; Production of palatinose by immobilized cells of *Erwinia rhapontici*. **Korean Journal of Biotechnology and. Bioengineering**, v. 7, p.79–83, 1992.
65. ZHANG, D.; LI, X.; ZHANG, L-H. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: Gene cloning and characterization and engineering of thermostability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p.2676-2682, 2002.