

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

**Produção de Fruto-oligossacarídeos e Aspectos da
Biosseparação das Frações Leves de Levana Hidrolisada.**

Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra

Recife - 2006

Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra

**Produção de Fruto-oligossacarídeos e Aspectos da
Biosseparação das Frações Leves de Levana hidrolisada.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Prof^a. Dra. Glícia Maria Torres Calazans

Recife – 2006

Coimbra, Cynthia Gisele de Oliveira

Produção de fruto-oligossacarídeos e aspectos da biosseparação das frações leves de levana hidrolisada / Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra. – Recife : O Autor, 2006.

xvi, 104 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Microbiologia aplicada – *Zymomonas mobilis* – Levanassacarase. 2. Fruto-oligossacarídeos e levana – Produção – Via fermentativa e produção enzimática. 3. Levana hidrolisada – Frações leves – Biosseparação. I. Título.

577.114

CDU (2.ed.)

UFPE

572.565

CDD (22.ed.)

BC2006 – 435

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *CYNTHIA GISELE DE OLIVEIRA COIMBRA* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 12 DE JULHO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dr. CARLOS EDISON LOPES
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dr. IRAPUAN OLIVEIRA PINHEIRO
Departamento de Ciências Fisiológicas - UPE



Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha
Departamento de Engenharia Química - UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

REITOR DA UNIVERSIDADE
Prof Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (Propesq)
Prof. Dr Celso Pinto de Melo

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Profª Dra. Míriam Camargo Guarnieri

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
Profª Dra Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
Profª. Dra. Norma Buarque de Gusmão

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS
Profª Dra. Glícia Maria Torres Calazans

VICE-CORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS
Prof. Dr. Alexandre Góes

À Lúcia Maria de Oliveira Coimbra;
À Conceição Maria de Oliveira Coimbra.

AGRADECIMENTOS

A Lúcia Coimbra, minha mãe, por todo amor, cumplicidade, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha tia, Conceição Coimbra, por todos os ensinamentos, amor, e incentivo.

A Glícia Maria Torres Calazans, profissional e pessoa admirável com quem aprendi muito. Agradeço pela orientação, pelo compromisso, pela amizade e pela prazerosa e leve convivência.

Ao professor Carlos Edison Lopes, pela importante participação na realização deste trabalho, com suas valiosas observações e conselhos, sempre dados com prazer e interesse.

Aos professores José Otamar Falcão de Moraes e Eugênia Maranhão Rios pelo privilégio da convivência e oportunidade de aprender algo novo a cada contato.

A Irapuan de Oliveira Pinheiro, pesquisador e professor com quem tive o privilégio de conviver no Departamento de Antibióticos e usufruir de sua amizade, inteligência e prestatividade.

Aos professores Ana Maria Souto Maior, Ester Gouveia, Janete Magali de Araújo, Norma Gusmão, Fátima Queiroz, Sebastião Melo, Alexandre Góes, Ana Porto, Márcia Nascimento e José Marcos da Silva, pela boa vontade, desprendimento e pronta ajuda na resolução de problemas.

A Joserina Gusmão, Suely Rodrigues e Fátima Regina, por todo o auxílio que puderam me conceder nas suas áreas, sempre com muita boa vontade.

A Glória Maria Vinhas, por me trazer ao lugar certo, onde passei anos valiosos da minha vida e pude conviver com pessoas que me fizeram crescer muito como pessoa e como pesquisadora.

A todos os professores pelos quais já passei nesta vida que se esforçaram e deram o melhor de si em cada minuto de aula e orientação. Estes têm o meu reconhecimento e eterna gratidão, pois certamente componho um conjunto de todos os seus esforços.

Aos amigos conquistados durante o curso Fernanda Borba, Samantha Pinheiro, Fernanda Leitão, Fábio Portella, Rosa Elvira Areias, Vânia Lima, Cleiton Bispo, Patrícia Gomes, Ana Paula Valentim, Flaviana Carvalho, Ivana Cunha, Raphael Conti, e Adriana Nunes, pelo companheirismo e amizade em muitos momentos.

A Marcela Araújo, pela bela amizade que cresceu ao longo de todos estes anos de convivência.

A Marcela Araújo, Ulrich Vasconcelos, Gilvanda Ribeiro, Marcela Oliveira, Alice Cristiane e Jéfferson Almeida, meus "socorristas" em várias situações, muito atenciosos e sempre a postos.

Aos colegas do Laboratório de Processos Fermentativos, LPF, com os quais foram compartilhadas experiências, alegrias, preocupações e até mesmo trabalho.

A Deus, pela oportunidade de aprender novas lições em cada etapa da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. GERAL	3
2.2. ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. ZYMOMONAS MOBILIS	5
3.2. PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS E LEVANA POR VIA FERMENTATIVA	5
3.3. SÍNTESE DE LEVANA E OLIGOSSACARÍDEOS POR LEVANASSACARASES	7
3.4. POLI E OLIGOSSACARÍDEOS	23
3.5. PROPRIEDADES BENÉFICAS DOS OLIGOSSACARÍDEOS	26
3.6. OLIGOSSACARÍDEOS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS	31
3.7. SEPARAÇÃO DE POLI E OLIGOSSACARÍDEOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. MICRORGANISMO	45
4.2. PRODUÇÃO DE LEVANA	45
4.3. PRODUÇÃO DE FOS POR VIA FERMENTATIVA	45
4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LEVANASSACARASE SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE REAÇÃO.	46

4.5. TESTE DE INATIVAÇÃO DA LEVANASSACARASE PELOS REAGENTES DOS MÉTODOS DE ROE & PAPADOPUOLOS (1954) E DE MILLER (1959).	48
4.6. BIOSSEPARAÇÃO DAS FRAÇÕES LEVES DA LEVANA	51
4.6.1. PREPARO DAS FRAÇÕES LEVES DE LEVANA	51
4.6.2. TESTES DE PURIFICAÇÃO DE FOS E DE LEVANA UTILIZANDO UM SISTEMA DE PARTIÇÃO EM TRÊS FASES	53
4.6.3. CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE SOLUBILIDADE DAS FRAÇÕES DE LEVANA HIDROLISADA	54
4.7. TRATAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	55
4.7.1. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, FRUTOSE E SACAROSE	55
4.7.2. DOSAGEM DE FOS	55
4.7.3. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	56
4.7.4. DOSAGEM DA LEVANA POR PESO-SECO	56
4.7.5. DOSAGEM DE CARBOIDRATOS TOTAIS	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. FERMENTAÇÕES A 30, 35 E 40°C	57
5.2. DISTRIBUIÇÃO DOS FOS PRODUZIDOS A 30, 35 E 40°C	71
5.3. PRODUÇÃO DE FOS POR VIA ENZIMÁTICA NO MOSTO FERMENTADO SUBMETIDO A DIFERENTES CONDIÇÕES DE SACAROSE INICIAL, PH E TEMPERATURA.	74
5.4. TESTE DE INATIVAÇÃO DA LEVANASSACARASE PELOS REAGENTES DOS MÉTODOS DE ROE & PAPADOPUOLOS (1954) (ROE), PARA CETOSSES, E DE MILLER (1959), PARA AÇÚCARES REDUTORES (DNSA)	80
5.4. RECUPERAÇÃO DOS FOS PRODUZIDOS UTILIZANDO UM SISTEMA DE PARTIÇÃO EM TRÊS FASES (TPP)	83
5.5. CURVAS DE SOLUBILIDADE DAS FRAÇÕES LEVES DE LEVANA	88
6. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1- Estrutura química de 1-cestose, trissacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2 \rightarrow 1) a uma molécula de sacarose.	11
Fig. 2- Estrutura química de nistose, tetrassacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2 \rightarrow 1) a uma molécula de 1-cestose.	12
Fig. 3- Estrutura química de frutofuranosil-nistose, pentassacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2 \rightarrow 1) a uma molécula de nistose.	12
Fig. 4- Estrutura molecular da Arabinose	20
Fig. 5- Estrutura molecular da Xilose	20
Fig. 6- Estrutura molecular da Rafinose	21
Fig. 7- Estrutura molecular da Maltose	21
Fig. 8- Estrutura molecular da Melibiose	22
Fig. 9- Estrutura molecular da Celobiose	22
Fig. 10- Estrutura molecular da (α , α) e (α , β) Trealose.	22
Fig.11-Diagrama de fases (em proporção de massa) do sistema de três componentes água/sulfato de amônio/t-butanol a 25°C (Kiss, <i>et al.</i> , 1998)	40
Fig. 12- Representação esquemática do procedimento seguido para o teste da atividade enzimática da levanassacarase submetida a diferentes condições de reação.	46
Fig. 13- Representação esquemática do método usado para a verificação da inativação da levanassacarase pelos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954) e de Miller (1959).	50
Fig 14- Variações nas concentrações de FOS em relação às de Biomassa, Sacarose e Levana em fermentações realizadas a 30, 35 e 40°C.	58
Fig. 15- Soma das concentrações de glicose e frutose, representando ART na fermentação realizada a 40°C.	65

Fig. 16- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 40°C.	66
Fig. 17- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 35°C.	69
Fig. 18- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 30°C.	70
Fig. 19- Representação da atividade total da levanassacarase em meio fermentado sem células, submetido a diferentes condições de reação por 24h.	75
Fig. 20- Atividades de hidrólise e polimerização da levanassacarase em meio fermentado sem células, submetido a diferentes condições de reação por 24h.	76
Fig. 21- Primeiro teste realizado com levana total, sem centrifugação.	83
Fig. 22- Foto de um dos experimentos de TPP realizados com levana total antes da centrifugação.	83
Fig. 23- Foto de um dos experimentos de TPP realizados com levana total após a centrifugação.	83
Fig. 24- Percentual da levana nativa que se concentrou na lâmina interfacial (terceira fase do sistema) em relação à total adicionada ao sistema. Experimentos realizados a diferentes temperaturas por 1h.	84
Fig. 25- Percentual da levana total adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na fase mais densa (aquosa, com sulfato de amônio a 45%). Experimentos realizados a diferentes temperaturas por 1h	84
Fig. 26- Percentual da levana total adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial (terceira fase do sistema) e na fase densa (aquosa, com 45% de sulfato de amônio).	85
Fig. 27- Percentual da F-70 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial	87
Fig. 28- Percentual da F-80 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial	87

Fig. 29- Percentual da F-90 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial	87
Fig 30- Diagrama de solubilidade da fração 70 da levana hidrolisada (F-70) e posterior fracionamento.	90
Fig 31- Diagrama de solubilidade da fração 80 da levana hidrolisada (F-80) e posterior fracionamento.	90
Fig 32- Diagrama de solubilidade da fração 90 da levana hidrolisada (F-90) e posterior fracionamento.	90
Fig 33- Diagrama de solubilidade dos açúcares não precipitáveis em solução aquosa com 90% (m/m) de etanol, oriundos da levana hidrlisada (F >90), obtidos por hidrólise e posterior fracionamento.	90

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Condições de produção enzimática de Levana e Oligossacarídeos utilizadas em diferentes trabalhos com diferentes objetivos. Os rendimentos expressos em percentual são em relação à quantidade de sacarose inicial utilizada e não em concentração.	17
Tabela 2. Velocidades médias de produção ou consumo de FOS a 30, 35 e 40°C em g.L ⁻¹ .h ⁻¹	63
Tabela 3. Velocidades médias de produção ou consumo de Levana a 30, 35 e 40°C em g. L ⁻¹ .h ⁻¹	63
Tabela 4. Velocidades médias de consumo de Sacarose a 30, 35 e 40°C em g. L ⁻¹ .h ⁻¹	63
Tabela 5- FOS detectados nos tempos de fermentações realizadas a 30, 35 e 40°C	73
Tabela 6- Concentrações em g/L de ART nas amostras dos grupos 5 e 6 com levanas recém produzida e liofilizada.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ - Velocidade de crescimento da população microbiana.

AI- açúcar invertido

ART- açúcares redutores totais

BSA- albumina sérica bovina

CLAE- Cromatografia Líquida de alta eficiência

DP (Degree Polymerisation) – Grau de polimerização- número de unidades monoméricas que compõem uma cadeia oligossacarídica.

EtOH- etanol

FOS (fruto-oligossacarídeos) - oligossacarídeos cujos monômeros são moléculas de frutose.

Fru- frutose

GFOR- glicose-frutose óxidoredutase (EC 1.1.99.28).

Gli- glicose

KDa- kilodaltons

ML- Meio de produção

mNm⁻¹- mili Newton por metro

MPF- Meio de pré-fermentação

SSDL- Meio Standard de Swing & De Ley

TPP (Three-Phase Partitioning)- Sistema de partição em três fases

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar e estudar a produção fermentativa e a enzimática de fruto-oligossacarídeos, bem como estudar formas de biosseparação das frações leves de levana. No estudo da produção de FOS por fermentação, foram testadas temperaturas de 30, 35 e 40°C, parâmetro de forte influência no tamanho das cadeias formadas. Para a produção enzimática, a levanassacarase foi submetida a diferentes condições de temperatura, de pH e de concentração de sacarose. A purificação das frações leves de levana, tanto pelo método clássico de adição de um não-solvente quanto por partição em três fases, foi estudada. Os resultados obtidos mostraram que a melhor temperatura para a produção de FOS por via fermentativa e mais favorável à atividade de transfrutossilacção da levanassacarase é de 40°C, dentre as testadas. Nos processos fermentativos, a temperaturas que favorecem a produção de oligossacarídeos são contrárias às que favorecem a produção de levana. A construção de diagramas ternários para os sistemas água / fração de levana / etanol mostrou que as curvas de solubilidade das referidas frações neste sistema apresentaram-se diferentes do esperado. No entanto, evidenciou-se a eficiência do método, uma vez que pode ser aplicado em soluções bastante diluídas de frações leves de levana. Nos sistemas de partição em três fases testados para a recuperação da levana total e das frações leves da levana hidrolisada, os rendimentos foram muito baixos. O melhor rendimento obtido foi para a fração 90, da qual se recuperou uma porção de 27% do total do carboidrato. É possível que este rendimento possa ser elevado após um estudo de otimização do método.

ABSTRACT

The aim of this work was to compare and to study the fermentative and enzymatic fructo-oligosaccharides (FOS) production as well as light fraction bioseparation. The fermentations were conducted at 30, 35 and 40°C, considering that temperature is an important parameter for the polymerization. Enzymatic production was developed by using levansucrase in different conditions of temperature, of pH and of sucrose concentration. It was studied the extraction of levan light fractions by using a non-solvent and by three-phase partitioning. The results showed that 40°C was the best temperature to produce FOS by fermentative pathway. In fermentative process, temperature conditions that give support to production of oligosaccharides are opposite to the levan production. The ternary diagrams of water/ levan/ ethanol systems showed that they have different behavior of that one expected, and demonstrated the efficiency of the methodology by using solutions extremely diluted. The three-phase partitioning systems for total and light fraction of hydrolyzed levan presented low yield. The best result obtained was to the fraction F-90 with a 27% of the carbohydrate in sheet. Besides, it should be considered that the yields could be improved by optimization studies.

1. INTRODUÇÃO

Zymomonas mobilis ZAG 12 é uma bactéria Gram-negativa, cujo crescimento em sacarose é acompanhado pela formação extracelular de fruto-oligossacarídeos (FOS), levana e sorbitol (Swings & De Ley, 1977; Sprenger, 1996). Ela produz a enzima levanassacarase (EC 2. 4. 1. 10), uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise da sacarose bem como a transfrência do grupo frutossil deste dissacarídeo para aceptores, gerando as cadeias de frutose. A levanassacarase é encontrada no meio fermentado complexada à cadeia de frutose produzida, ou seja, na forma de um complexo levana-levanassacarase, e é nesta forma que é utilizada em experimentos de atividade e produção.

O tamanho médio das cadeias produzidas durante uma fermentação com a *Z. mobilis* em meio de sacarose varia com as condições do processo. A geração de cadeias menores, como as da faixa de oligossacarídeos, é favorecida por altas temperaturas e concentrações de sacarose menores que as usadas para a obtenção de cadeias maiores.

Os produtos de polimerização da frutose pela levanassacarase, levana e fruto-oligossacarídeos (FOS), podem ser obtidos também pela adição do complexo levana-levanassacarase a soluções concentradas de sacarose. Neste caso, para a produção de oligossacarídeos, tem-se utilizado temperaturas e concentrações de sacarose bem mais altas que nas produções por fermentação.

A ingestão de FOS interfere no metabolismo dos lipídeos reduzindo o colesterol sérico, além de estimular a absorção intestinal de minerais como cálcio, magnésio e ferro. São considerados fibras solúveis, que facilitam o trânsito intestinal e reduzem o risco de câncer de cólon. São prebióticos, uma vez que estimulam o crescimento e a proliferação de bactérias comprovadamente probióticas, como as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estes probióticos produzem ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, o propionato e o butirato, responsáveis pela inibição de bactérias patogênicas no cólon, e até estimulação de apoptose, desfavorecendo a formação de tumores.

Para a purificação da levana, geralmente se procede a uma precipitação pela adição de etanol até concentração de 75% a baixas temperaturas. Porém, as cadeias com baixo peso molecular permanecem no sobrenadante e volumes muito

elevados deste não-solvente têm que ser adicionados. Além da precipitação com não-solvente, outras técnicas podem ser usadas para a recuperação de carboidratos de uma solução aquosa. Uma delas é a partição em três fases (TPP). Neste caso, trabalha-se adicionando sulfato de amônio à solução do carboidrato até uma concentração próxima à da saturação, e t-butanol. Após a homogeneização, há a formação de três fases, dentre as quais a do meio concentra o soluto desejado.

Curvas de solubilidade podem fornecer dados sobre o comportamento de levanas com variadas faixas de peso molecular em ambas as técnicas citadas. A construção de diagramas triangulares permite o conhecimento de sistemas ternários que resultam em uma ou duas fases. Sistemas de quatro componentes, que resultam em uma, duas ou três fases, como é o caso TPP, devem ser representados por diagramas com quatro ângulos, como uma pirâmide, mas sua construção é bastante trabalhosa, o que desestimula seu uso.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a produção de FOS e a biosseparação das frações leves de levana hidrolisada

2.2. Específicos

1. Selecionar as melhores condições de produção por via fermentativa a partir da sacarose.
2. Selecionar as melhores condições de produção usando-se apenas o complexo levana-levanassacarase em meio contendo sacarose.
3. Comparar as duas formas de produção testadas na tentativa de eleger a mais adequada.
4. Testar os reagentes classicamente utilizados para a dosagem de açúcares redutores e de aldoses como inativadores da levanassacarase.
5. Testar a eficiência do método de partição em três fases para a purificação de levana e das frações mais leves da levana hidrolisada.
6. Traçar diagramas ternários para os sistemas água / frações leves de levana hidrolisada / etanol.
7. Realizar um estudo comparativo das curvas de solubilidade traçadas.
8. Avaliar a substituição do método de precipitação, classicamente aplicado, pelo de partição em três fases.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Diversas plantas e microrganismos produzem poli e oligossacarídeos. Dentre as fontes vegetais podemos citar cebola, agave, alcachofra de Jerusalém, aspargo, beterraba entre outras. Já entre os microrganismos produtores de fruto-oligossacarídeos, tem-se fungos como *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Arthrobacter* sp. e *Fusarium* sp., entre outros, e bactérias como *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *B. reuteri*, *B. polymixa*, *Aerobacter laevanicum*, *Aerobacter urefaciens*, *Erwinia ammylovora*, *Erwinia herbicola*, *Rahnella aquatilis*, *Serratia* sp. e *Microbacterium* sp., além de *Acetobacter xylinum* NCI 1005, que produz uma polifrutana tipo levana, com ligações β -(2 \rightarrow 6) (Yun, 1996; Oseguera *et al*, 1996; Cha *et al*, 2001; Tajima *et al*, 1997).

A polimerização de açúcares por frutotransferases de microrganismos está incluída em uma variedade de processos a que a célula recorre em situações de estresse ou para facilitar a sua sobrevivência em meios competitivos ou hostis. Para o *Bacillus subtilis*, a produção de levana permite sua sobrevivência no solo; promove a característica fitopatogênica de *Erwinia* e de espécies de *Pseudomonas*; ou a simbiose com plantas como o caso *Bacillus polymixa*, conforme relatado por Hernandez *et al* em 1995 (Ammar *et al*, 2002).

A síntese de exopolissacarídeos por bactérias produtoras de ácido láctico tem sido repetidamente relacionada à melhora da sobrevivência destas bactérias em condições adversas como estresse ácido, inanição e presença de inibidores de membrana. Schwab & Gänzle (2006), ao estudarem a regulação da produção de poli e oligossacarídeos e a expressão de glicosiltransferases em *Lactobacillus reuteri*, em resposta à aplicação de ativos inibidores de membrana, afirmaram que os produtos das glicosiltransferases (dextrana, levana e oligossacarídeos) promovem uma significativa proteção a estes inibidores, uma vez que as concentrações inibitórias mínimas tiveram que ser aumentadas até dez vezes na presença destes produtos para que as células fossem inibidas. Eles atribuíram o efeito protetor de frutanas e FOS à sua específica interação com os grupos polares dos lipídeos das membranas biológicas, que mantêm a membrana em uma fase líquido-cristalina fisiológica sob condições adversas como desidratação e congelamento.

3.1. *Zymomonas mobilis*

Desde que *Z. mobilis* foi nomeada pela primeira vez, em 1928, ela já pertenceu a cinco gêneros, até que, a partir de 1936, foi fixada no gênero *Zymomonas*. Neste gênero, há cepas que crescem e outras que não são capazes de crescer em sacarose. Mas, a habilidade para metabolizar a sacarose não está correlacionada a nenhum fator de valor taxonômico, e é um fenômeno indutível cepa-específico (Swings & De Ley, 1977).

Zymomonas são bactérias Gram-negativas, com 2-6µm de comprimento e 1-1,5µm de diâmetro, e se apresentam ao microscópio como células isoladas, mas muitas vezes em pares. É anaeróbia facultativa e uma minoria das linhagens é móvel, possuindo 1 a 4 flagelos polares. Produz etanol a partir da glicose pela via de Entner-Doudoroff (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, KDPG), utiliza somente três açúcares como fontes de carbono e energia, a glicose, a frutose e a sacarose. O crescimento em sacarose é acompanhado pela formação extracelular de fruto-oligossacarídeos (FOS), levana e sorbitol, com significativa redução na síntese de etanol (Swings & De Ley, 1977; Sprenger, 1996).

O conteúdo macromolecular (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos) das células de *Z. mobilis* é diferente quando cultivada em glicose do que quando cultivada em sacarose. O conteúdo celular destes componentes reflete as condições fisiológicas do microrganismo, além de permitir a monitoração do processo fermentativo. Quando cultivadas em meio de sacarose, *Z. mobilis* apresentou um maior dinamismo na composição macromolecular das células e também foi encontrada uma concentração 4,5 vezes maior de carboidratos, além dos lipídeos, que também se encontravam em concentrações mais elevadas na biomassa cultivada em sacarose do que em meio de glicose. A biomassa crescida em glicose, por sua vez, apresentou mais elevadas concentrações de proteína. (Grube *et al*, 2002).

3.2. Produção de oligossacarídeos e levana por via fermentativa

Z. mobilis polimeriza a frutose da sacarose provavelmente para reduzir a osmolaridade de meios muito concentrados e, conseqüentemente, o estresse osmótico. A levana é produzida pela *Z. mobilis* a partir da sacarose, mas não a partir

de uma mistura de glicose e frutose. E esta produção também depende da concentração de sacarose no meio, de forma que se esta for muito baixa (em torno de 0,5g/L) a formação de levana cessa e somente frutose livre é liberada para o meio, o que confirma a necessidade de redução do estresse osmótico (Swings & De Ley, 1977).

Viikari (1986) verificou a formação de oligossacarídeos, contendo uma unidade de glicose e duas, três ou quatro unidades de frutose, em fermentações com concentrações elevadas de sacarose, ou na fase de declínio, onde as levanas produzidas começam a ser hidrolisadas. A autora afirmou que, em fermentações em batelada com *Z. mobilis*, estes oligômeros representaram 7% do carbono original e fizeram parte de uma fração não precipitável pelo etanol nas condições adotadas para recuperação de levana do meio fermentado.

Tanaka *et al* (1980), ao analisar as levanas de baixo peso molecular produzidas pela levanassacarase de *B. subtilis* afirmaram que unidades de glicose também estavam presentes nestas cadeias como resíduos terminais.

O processo de polimerização da frutose para formação da levana origina cadeias de tamanhos moleculares variados, que vão da faixa dos oligossacarídeos com os menores graus de polimerização (DP - degree of polymerization) aos polímeros com os mais altos pesos moleculares (Viikari, 1986; Calazans *et al.*, 1997). Isto ocorre porque os polissacarídeos são produzidos como uma mistura de tamanhos moleculares que atendem a uma curva de distribuição de pesos moleculares de formato gaussiano (Calazans *et al.*, 1997; Calazans *et al.*, 2000).

Com o estudo das condições de processo pode-se deslocar o ápice da curva, tanto no sentido das pequenas quanto no das maiores moléculas. Ou seja, de acordo com as condições de processo (temperatura, composição do meio de fermentação, pH, agitação, dentre outros parâmetros) essas cadeias de baixo peso molecular poderão estar presentes ao final da fermentação em maior ou menor quantidade (Calazans *et al.*, 1997). Portanto, utilizando-se a mesma bactéria e o mesmo meio de fermentação, é possível obter poli ou oligossacarídeos como produto principal, manipulando-se as demais condições de fermentação, tais como pH, temperatura, agitação (Coimbra, 2003).

Melo & Calazans (2000) e Coimbra *et al.* (2002) estudaram as melhores condições para a produção de levana e oligossacarídeos por via fermentativa em meio de sacarose, utilizando-se a bactéria *Zymomonas mobilis* ZAG 12 (UFPEDA 241). Neste estudo, foram variadas a temperatura, a agitação e a concentração inicial de sacarose. Os resultados confirmaram a influência da temperatura sobre a produção de polímeros e oligômeros, sendo a temperatura mais alta, dentre as estudadas, 30°C, a mais favorável à obtenção de maiores quantidades de oligossacarídeos (116,38 g/L), e as mais baixas à de levana.

Grube *et al* (2002) produziram levana em um processo em dois estágios com *Z. mobilis* 113 S e obteve um rendimento de 15-20g/L. Bekers *et al* (2001) afirmam que com esta cepa de *Z. mobilis*, 30-50g/L de levana podem ser acumulados durante um processo em batelada ou produção contínua, e em 2005, Bekers *et al*, utilizando a mesma cepa de *Zymomonas* obtiveram 39,1g/L de levana também em um processo em dois estágios, que é um rendimento muito bom.

Coimbra (2003) verificou que a produção dos diferentes tamanhos de oligossacarídeos varia durante todo o processo fermentativo e atentou para a possibilidade de se obter oligossacarídeos de DP's maiores ou menores, dependendo do tempo de processo em que estes fossem extraídos. Verificou também que a maior concentração de FOS totais no meio ocorreu às 9 h de fermentação e a maior concentração de levana às 12 h de processo, quando realizado a 30°C, 100 rpm e 150 g/L de sacarose inicial.

3.3. Síntese de levana e oligossacarídeos por levanassacarases

Para a produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*, a sacarose é hidrolisada, a glicose é prioritariamente consumida como fonte de carbono e energia, e a frutose é polimerizada. Estudos sobre o metabolismo da sacarose por esta bactéria revelaram três enzimas hidrolizantes em suas células. São elas: (1) SacA ou InvA, uma sacarase intracelular; (2) B46 ou InvB, uma sacarase extracelular, responsável por 60% da atividade de hidrólise extracelular da sacarose; e (3) SacB, levanassacarase extracelular, uma β -frutofuranosidase, única responsável pela hidrólise da sacarose e formação de levana, com massa molecular

de 56KDa (Kannan, Mukundan & Gunasekaran, 1993 apud Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001).

A levanassacarase é bifuncional e sua estrutura e domínios, bem como seu mecanismo de síntese de frutooligossacarídeos e levana a partir da sacarose ainda não são completamente conhecidos. Muitos investigadores têm se empenhado neste sentido e, contribuindo com suas descobertas, aproximam-se cada vez mais da elucidação completa deste mecanismo de ação e conhecimento dos sítios de ligação desta macromolécula (Hijum, 2003; Ozimek *et al.*, 2004; Meng & Futterer, 2003; Park *et al.* 2003; Jang *et al.* 2001; Crittenden & Doelle, 1994; Vigants *et al.* 1998).

A levanassacarase de *Z. mobilis* teve sua atividade de polimerização anulada ao ser submetida a *p*-cloromercuriobenzoato e a anidrido maleico, específicos para grupos tiol, confirmando a presença de três resíduos de cisteína do sítio ativo da enzima. A atividade de hidrólise, porém, foi retida, e ao testar a adição de β -mercaptoetanol, dietilpirocarbonato e fenilmetilsulfonilfluoreto à levanassacarase, não houve alterações em suas atividades, sugerindo a ausência de histidina e tirosina no sítio catalisador (Sangiliyandi, Raj & Gunasekaran, 1999).

Senthikumar *et al* (2003) afirmaram que os resíduos de cisteína na levanassacarase de *Z. mobilis* desempenham uma função, possivelmente mantendo um adequado microambiente no sítio ativo da enzima. Isso após substituírem os resíduos de cisteína presentes na levanassacarase de *Z. mobilis* nas posições 121, 151 e 244 por serina e verificarem a consequente abolição da atividade formadora de levana da levanassacarase, enquanto a atividade de hidrólise da sacarose foi apenas reduzida à metade, possivelmente devido a mudanças conformacionais.

Sangiliyandi & Gunasekaran (2001) confirmaram, por mutagênese *in vitro* e elevada temperatura, a idéia de que os sítios ativos em que ocorrem a hidrólise da sacarose e a transfrutossilação não estão acoplados. Isto porque a enzima mutante manipulada por estes pesquisadores exibiu somente a atividade de hidrólise da sacarose, sem formação de levana.

Devido ao grande interesse nos produtos da levanassacarase, é sempre válido o estudo das maneiras de obtê-los em grandes quantidades. Quanto aos rendimentos em levana e oligossacarídeos, os melhores obtidos, até agora, foram

por síntese enzimática. É de se esperar, portanto, que haja também interesse na obtenção da enzima.

A levanassacarase pode ser obtida por precipitação do complexo levana-levanassacarase por adição de um não-solvente como o etanol ao meio fermentado, como feito por Calazans (1997), Calazans *et al* (1997) e Calazans *et al* (2000). Pankova *et al* (1990) mostraram, usando métodos cromatográficos, que a composição do precipitado de levana, obtido após produção e precipitação com etanol, era 93% de frutose, 2-3% de glicose e 2-3% de manana. Reece & Avigad, em 1996, mostraram que o referido precipitado é uma mistura do polissacarídeo com a levanassacarase (Grube *et al*, 2002). Grube *et al* (2002), inspirando-se nestes dois trabalhos, analisaram o precipitado de levana por espectroscopia de infravermelho e compararam com o espectro da frutose. Confirmando o que já havia sido relatado por outros autores, Grube *et al* (2002) obtiveram a prova de que o precipitado se tratava de um polímero de frutose, mas que também estavam presentes outros carboidratos, bem como pequenas quantidades de aminoácidos provenientes da degradação de proteínas e quantidades ínfimas de ácidos nucleicos. Não foram encontrados lipídeos.

Estudos mostraram que o sedimento de levana contém levanassacarase ativa e que pode ser usado como biocatalisador para produzir xarope de frutana a partir de sacarose (Bekers *et al*, 2005).

Outra forma eficiente encontrada e bastante utilizada para obter a levanassacarase foi pela clonagem do gene e expressão em *E. coli* (Sangiliyandi *et al*, 1999; Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001; Senthikumar *et al*, 2003; Sunitha *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2001; Támbara *et al.*, 1999). Desta maneira, vários autores têm estudado a levanassacarase de *Z. mobilis* e de *Acetobacter diazotrophicus* produzida em *E. coli* recombinante.

Está mais que provado que as atividades de transfrutoseilação e de hidrólise da sacarose da levanassacarase são realizadas em sítios ativos distintos. O que falta ainda é conhecer melhor a maneira como estes sítios interagem com seus substratos e, principalmente, entre si. Sabe-se que a formação de levana depende, além dos fatores ambientais (temperatura e concentrações de glicose, frutose e

sacarose), da taxa de hidrólise da sacarose. Mas, sabe-se, também, que as condições que favorecem uma atividade são as que inibem a outra.

Kobayashi & Matsuda, em 1978, afirmaram que o mecanismo de alongação das cadeias de levana e de dextrana de *Bacillus subtilis* é do tipo ping-pong. Este é um mecanismo enzimático para reações com mais de um substrato; segundo o qual o primeiro substrato modifica a enzima permitindo a sua ligação ao segundo substrato. Também se denomina mecanismo de duplo deslocamento (<http://www.viatusalud.com/diccionario.asp?S=M&P=59&T=2>, 2006).

Quanto melhor se conhece a estrutura e o funcionamento de uma determinada enzima, melhor é o aproveitamento de seu potencial e maior o leque de modificações que podem ser feitas para que seus produtos possam ser obtidos de uma maneira mais fácil e rentável. Este conhecimento pode ser aplicado em diferentes situações no caso da levanassacarase de *Zymomonas*, com diferentes finalidades. Seja para trabalhar com mais clareza as formas de aumentar a atividade de transfrutossilacção, obtendo assim elevados rendimentos de levana ou de oligosacarídeos; ou para abolir esta atividade e desta forma direcionar o maior percentual possível do substrato para a produção de etanol nos processos fermentativos (Sangiliyandi *et al*, 1999; Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001; Senthikumar *et al*, 2003).

Segundo Hijum (2003), as enzimas frutossiltransferases (FTS) bacterianas realizam 3 tipos de reação com a sacarose: (1) hidrólise, quando a sacarose é invertida em frutose e glicose; (2) polimerização, quando a unidade de frutose é ligada a um polímero frutossil; e (3) transferase, de frutose para um aceptor, formando um oligossacarídeo. FTS que produzem polímeros frutana cujas ligações entre as unidades frutossil são do tipo β -(2 \rightarrow 1) são chamadas de inulossacarases (E.C.2.4.1.9). Levanassacarases (E.C.2.4.1.10) são as que sintetizam levana (frutanas que têm ligações tipo β -(2 \rightarrow 6) entre suas unidades frutossil).

As levanassacarases ocorrem mais comumente entre bactérias e têm sido estudadas em mais detalhes que as inulossacarases, provavelmente pela sua maior facilidade de obtenção. Por outro lado, os FOS tipo inulina são muito mais bem estudados quanto às suas aplicações e efeitos quando ingeridos do que os FOS tipo levana. Inclusive, autores têm afirmado que é um consenso entre os cientistas o fato

de que apenas as frutanas com ligações tipo β -(2 \rightarrow 1) têm sua habilidade prebiótica bem documentada (Biedrzcka & Bielecka, 2004; Gibson, 2004-B).

Parece até um pouco contraditório a inulina e seus FOS terem suas propriedades prebióticas tão bem investigadas, enquanto a levana e seus FOS, produtos da levanassacarase, enzima muito mais bem estudada que a inulossacarase, não terem suas propriedades prebióticas pesquisadas. Mas como as principais fontes de inulina e seus FOS (vegetais como cebola, alcachofra de Jerusalém, chicória, aspargo, beterraba e outros) sempre fizeram parte da dieta humana, é possível compreender que estes últimos e suas propriedades tivessem sido descobertos muito antes. Por isso, foi gerada uma quantidade muito maior de informações sobre seus efeitos benéficos do que sobre os dos FOS tipo levana. Há autores, inclusive, desta linha de pesquisa, que restringem a definição de FOS àqueles oligômeros cujas unidades frutósídicas são unidas por ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1), como Biedrzcka & Bielecka (2004) e Gibson (2004-B).

Os principais FOS estudados parecem ser 1-cestose (Fig. 1), nistose (Fig. 2) e frutofuranosilnistose (Fig. 3), devido à quantidade de vezes que são citados e usados como referência em trabalhos. Interessantemente também, estes FOS são produzidos tanto por inulossacarases quanto por levanassacarases.

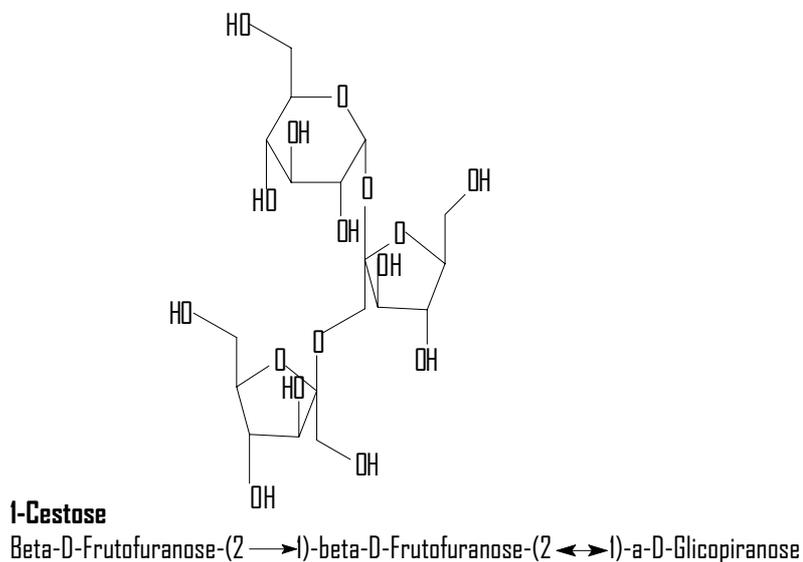
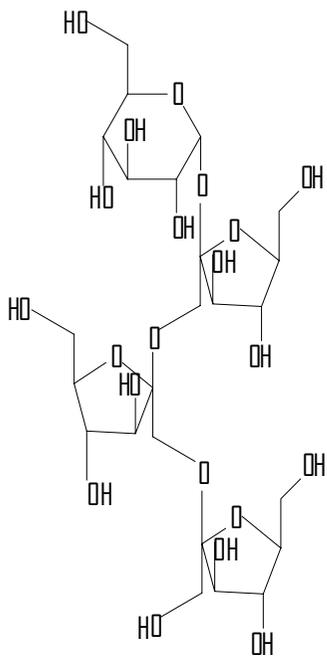


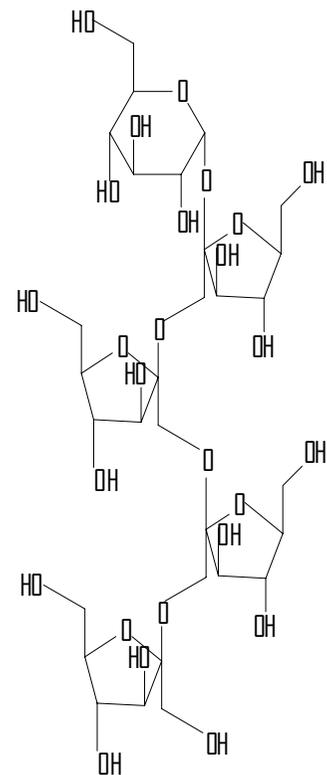
Fig. 1- Estrutura química de 1-cestose, trissacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2 \rightarrow 1) a uma molécula de sacarose.



Nistose

Beta-D-frutofuranosil-(2→1)-beta-D-frutofuranosil-(2→1)-
beta-D-frutofuranosil-(2↔1)-a-D-glicopiranosose

Fig. 2- Estrutura química de nistose, tetrassacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2→1) a uma molécula de 1-cestose.



Frutofuranosil-nistose

Beta-D-frutofuranosil-(2→1)-beta-D-frutofuranosil-(2→1)-
beta-D-frutofuranosil-(2→1)-beta-D-frutofuranosil-(2↔1)-a-D-glicopiranosose

Fig. 3- Estrutura química de frutofuranosil-nistose, pentassacarídeo resultante da adição de um frutossil com ligação tipo β -(2→1) a uma molécula de nistose.

Hijum (2003), por exemplo, fez a caracterização bioquímica de uma inulossacarase mutada (Inu Δ 699His), com deleção de 100 aminoácidos no C-terminal, de *Lactobacillus reuteri* 121 cujo gene foi expresso em *E. coli*. Afirmou, a partir dos dados coletados, que a referida mutação pareceu não ter afetado nem a atividade da enzima nem a formação do produto, apesar de ter produzido uma grande quantidade de FOS, expressos em 1-cestose (95%) e nistose (5%) a partir da sacarose.

Para levanassacarases, apenas têm sido observadas cinéticas do tipo Michaelis-Menten enquanto a cinética da “Inu transferase” é melhor descrita pela equação de Hill (Hijum, 2003). A enzima Inu de *L. reuteri* 121 produziu grandes quantidades de FOS 1-cestose (Fig. 1). A produção de 1-cestose tem sido relatada com FTS's de *Paenibacillus polymyxa* CF43 (Bezzate, 2000 apud Hijum, 2003), *G. diazotrophicus* SRT4 (Hernandez, 1995 apud Hijum, 2003) e *Zymomonas mobilis* ATTC10988 (Song, 1994 apud Hijum, 2003). Curiosamente, os principais produtos dessas enzimas são polímeros levana, com ligações frutósídicas do tipo β - (2 \rightarrow 6). 1-cestose possui um frutossil β -(2 \rightarrow 1) ligado na frutose da sacarose (Fig. 1). O fato dessas enzimas produzirem levana e 1-cestose levou Hijum (2003) a sugerir a presença de dois sítios ligantes nas enzimas FTS: um gerando 1-cestose, moléculas “primer”, que são subsequenteiramente usadas por um segundo sítio ligante no processo de polimerização e outro para a reação de polimerização, o que havia sido também proposto para as enzimas FTS de *S. salivarius* por Song & Jacques (1999).

Na verdade, apesar de muita especulação sobre o verdadeiro número de sítios ativos e de como eles agem, como se inicia a polimerização, a formação das moléculas iniciadoras, etc, ainda há muito o que ser investigado. Ainda há muitas suposições a serem confirmadas ou descartadas, além de ter que se considerar as particularidades das diferentes frutotransferases. A existência de três sítios ativos (o primeiro para hidrólise, o segundo para a reação de transfrutossilacção com formação de primers e o terceiro para a polimerização a partir dos primers formados) apesar de não estar confirmada, parece ter sentido.

Támbara *et al.* (1999), estudando a produção de FOS pela levanassacarase de *Acetobacter diazotrophicus*, uma bactéria endofítica da cana-de-açúcar, detectaram e isolaram 1-cestose e nistose - tri e tetrassacarídeos (Fig. 1 a 3), cuja

composição foi confirmada pela proporção glicose:frutose (1:2 e 1:3, respectivamente) após hidrólise ácida e do tipo de ligação (β -(2 \rightarrow 1)) ser elucidado após análise por espectrometria de ^{13}C -RMN. Esta enzima também produziu frutana de alto peso molecular em placa, só que com ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6), que caracteriza levana. Isso leva a sugerir também a formação de um trissacarídeo com este tipo de ligação, o qual não foi detectado, provavelmente, devido à sua rápida utilização para a formação de levana. A habilidade para produzir FOS β -(2 \rightarrow 1) além de levana, a partir de sacarose, também foi relatada para levanassacarases de outros microrganismos, como *Z. mobilis* (Crittenden & Doelle, 1993), *Erwinia herbicola* (Hestrin *et al.*, 1956) e *B. subtilis* (Euzenat *et al.*, 1997).

Coimbra *et al* (2003), em seu estudo cinético da produção de oligossacarídeos com diferentes DP's, depararam-se com um fato semelhante uma vez que não detectaram oligossacarídeo com DP 3 (independente do tipo de ligação entre seus monômeros) em nenhuma das amostras analisadas. Sugeriram, então, a mesma causa para explicar esta constatação: provavelmente o oligossacarídeo com DP 3 é precursor da síntese dos demais tamanhos moleculares e, por isso, é consumido tão rapidamente que não se encontra no meio em concentrações detectáveis.

Segundo Herinssat (1991) e Hijum (2003), as FTS pertencem à família 68, de glicosídeo hidrolases (GH68). Sintetizam inulina, formada por resíduos frutose β -(2 \rightarrow 1) ligados (inulossacarase, Inu, E.C.2.4.1.9) ou levana, formada por resíduos de frutose β -(2 \rightarrow 6) (Levanassacarase, E.C.2.4.1.10) ligados. São enzimas que empregam um mecanismo de duplo deslocamento que envolve a formação e hidrólise de um intermediário covalente glicosil-enzima, com um estado de transição como o íon oxocarbênio (Hijum, 2003; Ozimek *et al.*, 2004).

O sítio ativo dos membros da família GH68 (de glicosil hidrolases), segundo Ozimek *et al* (2004), é composto de uma tríade catalítica: um nucleófilo catalítico, um catalisador geral ácido-base e um estabilizador do estado de transição. O nucleófilo catalítico ataca o centro anomérico do açúcar, gerando o intermediário substrato-enzima. Em uma etapa subsequente, este intermediário sofre transglicosilação ou hidrólise. Ambas as etapas requerem assistência de um catalisador ácido-base e um estabilizador do estado de transição.

Meng & Futterer (2003), analisando a levanassacarase de *B. subtilis* por cristalografia, mostraram que dois resíduos (D86 e E342) estavam em íntimo contato com a sacarose e representavam, portanto, o nucleófilo catalítico e o estabilizador geral ácido-base, respectivamente. Um terceiro resíduo, o D247, por sua vez, foi identificado como o estabilizador do estado de transição através da observação de que ele forma fortes pontes de hidrogênio com as hidroxilas do carbono C3' e C4' da unidade frutossil. Concluíram também que este resíduo está longe da hidroxila do C2 ou do oxigênio glicosídico para ser um dos resíduos diretamente envolvidos na catálise. Referem-se ainda a evidências adicionais para a classe do D247, que vêm de estudos mutacionais no resíduo equivalente da levanassacarase de *Z. mobilis* (D194).

Lactobacillus reuteri 121 possui 2 genes que codificam FTS's (fft), um para uma inulossacarase e o outro para uma levanassacarase. Ozimek *et al.* (2004) caracterizaram mutantes sítio-direcionados da tríade catalítica nas duas FTS's deste microrganismo após modificações nos resíduos correspondentes ao nucleófilo catalítico, ao estabilizador do estado de transição e ao catalisador geral ácido/base. Eles verificaram que a atividade dos mutantes foi reduzida em até 10000 vezes quando comparada à da enzima selvagem. Quando a mutação foi no resíduo correspondente ao nucleófilo catalítico (Asp), a atividade foi abolida completamente. Assim como Meng e Futterer (2003) verificaram para a levanassacarase de *Bacillus subtilis*, Ozimek *et al.* (2004), através de espectros UV-CD das enzimas levanassacarase e inulossacarase selvagens e modificadas em sua tríade catalítica, verificaram que uma mínima ou nenhuma mudança estrutural ocorreu após a mutação e que, portanto, a mudança na natureza química dos resíduos mutados foi responsável pela inativação das enzimas.

A Tabela 1 reúne as condições de reação utilizadas ou selecionadas por vários autores para a síntese de levana e FOS utilizando levanassacarases de diversas fontes. As levanassacarases utilizadas nos cinco primeiros trabalhos referenciados são produzidas por bactérias e as dos cinco últimos, por fungos. Nem todos os autores objetivavam obter altos rendimentos dos produtos das levanassacarases. A maioria ainda estuda o mecanismo de catálise enzimática, os substratos ou produtos destas enzimas. As condições utilizadas são basicamente as

mesmas: o pH varia pouco, de 5 a 6; a temperatura é sempre elevada (a partir de 40°C), exceto quando se objetiva produzir levana de alto peso molecular; e a concentração inicial de sacarose no meio reacional é alta (acima de 400g/L), com poucas exceções.

Medida da atividade da levanassacarase

Quando a sacarose é hidrolisada, são geradas e liberadas quantidades equimolares de glicose e frutose. No entanto, quando a levanassacarase polimeriza o frutossil da sacarose hidolizada, apenas glicose é liberada para o meio. Para cada molécula de frutose que é adicionada a uma cadeia crescente de um oligo ou polissacarídeo, uma de glicose é liberada para o meio além das que já são pela inversão da sacarose. Então, as atividades da levanassacarase podem ser estimadas conhecendo-se as concentrações de glicose e frutose no meio reacional (Oseguera *et al.*, 1996; Hatakeyama *et al*, 1996; Bekers *et al*, 2002; Sangiliyandi *et al*, 1999; Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001; Jang *et al*, 2001; Sunitha *et al*, 2000).

Influência da temperatura na atividade da frutotransferase

A atividade de transfrutossilção, bem como o tamanho das cadeias formadas pelas levanassacarases são parâmetros que têm se mostrado bastante susceptíveis à temperatura de reação. Geralmente, a levanassacarase apresenta-se ativa de 4°C a 60°C, sendo que em temperaturas maiores que 60°C sua estabilidade é muito reduzida, havendo uma queda brusca na atividade da enzima. Esta faixa ampla de temperatura também promove uma variação grande na faixa de pesos moleculares médios do polissacarídeo produzido, sendo as temperaturas mais baixas as mais favoráveis à produção de cadeias mais longas, de alto peso molecular, enquanto que as temperaturas mais altas favorecem a produção de cadeias cada vez menores, com baixos pesos moleculares, chegando à faixa dos oligossacarídeos e de ART (Melo & Calazans, 2000; Coimbra *et al.*, 2002).

Tabela 1- Condições de produção enzimática de Levana e Oligossacarídeos utilizadas em diferentes trabalhos com diferentes objetivos. Os rendimentos expressos em percentual são em relação à quantidade de sacarose inicial utilizada e não em concentração.

MICROORGANISMO	ENZIMA	pH	TEMP. (°C)	S ₀	VOLUME DA MISTURA REACIONAL	AGITAÇÃO	TEMPO DE REAÇÃO	RENDIMENTO	AUTORES
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	50U	5,5	40	500g/L	200mL	200rpm	18h	50%	Támbara <i>et al.</i> , 1999
<i>Z. mobilis</i>	Complexo de 200mL de meio fermentado	-	45	50-60% (m/m)	100g	-	24h	182g/L	Bekers, 2002
<i>Z. mobilis</i>	0,3U	5	4	100g/L	1mL	leve	6-70h	80%	Jang <i>et al.</i> , 2001 (levana)
<i>Bacillus sp.</i>	0,5mL do extrato	6	50	360g/L	1mL	-	24h	200g/L	Ammar <i>et al.</i> , 2002 (levana)
<i>M. laevaniformans</i>	5 U	6,0	30°C	10g/L de sac+ 10g/L do acceptor	0,8mL	-	6h	-	Párk <i>et al</i> 2003. (oligos)
<i>Aspergillus niger</i>	0,5ml do meio fermentado sem células	5,0	40°C	166,7g/L	1,5mL	-	-	-	Hidaka <i>et al</i> , 1988 (oligos)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,5mL meio fermentado sem células	5,5	55°C	412,5g/L	2mL	-	24h	56%	Sangeetha <i>et al</i> , 2004 (oligos)
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,5mL meio fermentado sem células	5,5	55°C	600g/L	2mL	-	12h	54%	Sangeetha <i>et al</i> , 2004 (oligos)
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,5mL meio fermentado sem células	5,5	55°C	450g/L	2mL	-	-	53%	Sangeetha <i>et al</i> , 2005 A (oligos)
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,25mL meio fermentado sem células	5,5	-	450g/L	2mL	-	-	-	Sangeetha <i>et al</i> , 2005 B (oligos)

As temperaturas usadas para a produção de oligossacarídeos são elevadas, a partir de 40°C, enquanto as usadas para produção de levana são baixas, inferiores a 25°C (Tabela 1). Uma exceção encontrada foi a levanassacarase extraída de *Bacillus* termofílico, isolada do solo da Tailândia por Ammar *et al.* (2002), cuja temperatura ótima para produção de levana de alto peso molecular foi 50°C. A 30°C, o peso molecular médio do polissacarídeo produzido foi 8000g/mol, enquanto a 50°C, foram encontradas duas faixas de pesos moleculares, sendo grande a quantidade de cadeias com PM baixo, de 6000g/mol e na outra faixa predominavam cadeias com PM de 660.000g/mol. Outro caso extremo encontrado foi o da levanassacarase de *Z. mobilis* expressa em *E. coli* relatada por Belghith *et al.* em 1996, cuja temperatura ótima para a produção de levana era de 0°C (Ammar *et al.*, 2002).

De acordo com Park *et al.* (2003), a levanassacarase de *Microbacterium laevaniformans*, apresentou um maior rendimento em levana a 30°C e de ART a 45°C. Mas quando a atividade total (medida em quantidade de glicose liberada) da inulossacarase de *Lactobacillus reuteri* mutada foi medida, Hijum (2003) chegou à temperatura de 50°C como a ideal para a atividade da enzima. Estes dados não diferem muito levando-se em conta que a glicose é um açúcar redutor e este segundo autor não estava diferenciando as atividades de hidrólise e de polimerização da enzima.

A forma como a levanassacarase é utilizada também influencia o rendimento e o tamanho molecular das cadeias formadas. Ao comparar as levanas produzidas por três diferentes preparações de levanassacarase de *Z. mobilis* (livre, imobilizada e extraída por permeabilização com tolueno), Jang *et al.* (2001) verificaram que os rendimentos foram próximos, mas ao utilizar a levanassacarase imobilizada ou a que havia sido extraída das células por permeabilização com tolueno, obtinham-se levanas com menores pesos moleculares. Isso foi atribuído ao fato de a levanassacarase nestas duas preparações estar ligada mais fracamente à cadeia de levana. O maior rendimento (80%), porém, foi obtido com a enzima na forma livre, com a produção de levana de pesos moleculares bem mais altos. A temperaturas elevadas, o rendimento em levana é melhor com as formas imobilizada e extraída

por permeabilização com tolueno do que com a enzima livre, por aquelas serem mais estáveis que esta última forma.

Influência do pH na atividade de frutotransferases

Segundo Park *et al.* (2003), os valores de pH ideais para a formação de levana e de açúcares redutores pela levanassacarase de *Microbacterium laevaniformans* são, respectivamente, 6,5 e 6,0. A atividade de transfrutossilacção foi estável entre 5 e 7 e inativada acima de 9, pH em que a atividade de hidrólise ainda gera cerca de 6,6g/L de ART. Já Hijum (2003), em seu estudo de caracterização da inulossacarase de *Lactobacillus reuteri* mutada, com deleção de 100 aminoácidos, apontou a faixa de pH 5,0 - 5,5 como a ideal para a atividade da mesma.

Influência da concentração da sacarose na atividade da levanassacarase

A concentração de sacarose influencia o tipo de acceptor usado nas reações de transfrutossilacção catalisadas pela levanassacarase. A baixas concentrações de sacarose, a reação predominante é a hidrólise da sacarose a glicose e frutose, onde o acceptor é a água. A altas concentrações, a produção de oligossacarídeos foi a maior reação catalisada (Crittenden & Doelle, 1994).

Confirmando o verificado por Crittenden & Doelle, em 1994, Vigants *et al.* (1998) afirmaram que a ativação das reações catalisadas pela levanassacarase foi inversamente proporcional à concentração do substrato (sacarose) no meio reacional, sendo com a concentração de 23,4mM (~8g/L) a levanassacarase foi ativada 17x, enquanto com a concentração de 158M (~540g/L) a ativação foi de apenas 3x. Já Park *et al.* (2003) correlacionaram as condições de reação com a taxa de hidrólise/transfrutossilacção, sendo a taxa de hidrólise medida pela liberação de frutose e glicose e a taxa de transfrutossilacção medida pela formação de levana. Eles afirmaram, baseados nos resultados obtidos, que esta relação aumenta com a redução na concentração do substrato, a sacarose.

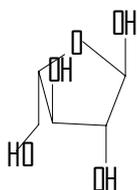
Especificidade da levanassacarase pelo substrato

Park *et al.* (2003) purificaram a levanassacarase de uma cepa de *Microbacterium laevaniformans*, a qual afirmaram estar também firmemente ligada à

levana, o que dificultava a sua separação do polímero, e caracterizaram suas propriedades enzimáticas com foco na reação de transfrutossilacção. Eles afirmaram que a levanassacarase tem um grande potencial para a síntese de uma grande variedade de frutossil oligossacarídeos, bem como para a síntese de levana após verificarem que esta enzima, além de unir os monômeros com mais de um tipo de ligação, é capaz de usar mais de um tipo de substrato.

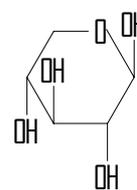
A levanassacarase de *M. laevaniformans* não só catalisa a transferência do frutossil da sacarose apenas na posição β -2,6, mas também na posição β -2,1, uma vez que a 1-cestose (O- β -D-fructofuranosyl-(2-1)- β -D-fructofuranosyl-(2-1)- α -D-glucopyranoside) foi detectada como um dos produtos da reação de transfrutossilacção desta enzima (Park *et al.*, 2003; Hijum *et al.*, 2003)

A levanassacarase é capaz de utilizar sacarose e rafinose como substratos para a síntese de levana e de FOS, mas não maltose (Sangiliyandi, Raj & Gunasekaran, 1999; Park *et al.*, 2003). Catalisa a liberação de açúcares redutores a partir de sacarídeos que tenham o terminal 2- β -D-fructofuranose, mas não cliva componentes como 1-cestose (Fig. 1) e nistose (Fig. 2) . Apresenta também uma larga especificidade de aceptor para o frutossil, sendo os dissacarídeos mais favoráveis que os monossacarídeos. Sacarídeos que têm um anel piranose na sua estrutura, como a galactose, a maltose (Fig. 7), a lactose, a melibiose (Fig. 8) e a celobiose (Fig. 9), foram melhores aceptores que os sacarídeos que têm o anel furanose como a arabinose (Fig. 4), a xilose (Fig. 5), e a rafinose (Fig. 6) (Park *et al.*, 2003).



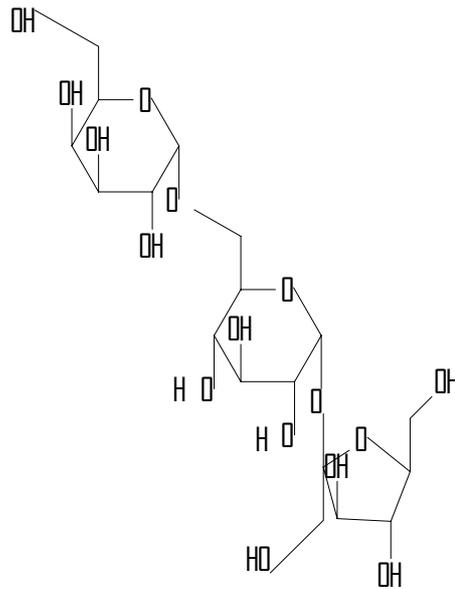
Alfa-L-arabinofuranose

Fig. 4- Estrutura molecular da Arabinose



Beta-D-xilopiranosose

Fig. 5- Estrutura molecular da Xilose

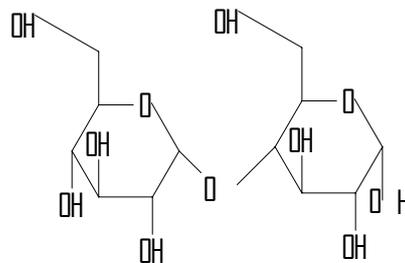


Rafinose

Alfa-D-Galactopiranosse-(1→6)-alfa-D-Glicopiranosse-(1→2)-beta-D-Frutofuranose

Fig. 6- Estrutura molecular da Rafinose

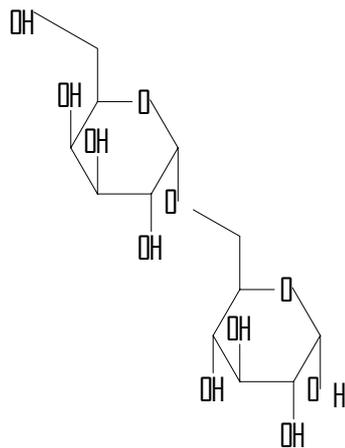
A maltose (Fig. 7), a melibiose (Fig. 8) e a celobiose (Fig. 9) foram os melhores aceptores entre os sacarídeos testados e, apesar de ter um anel piranosse em sua estrutura, não foi detectado produto de transfrutossilacção para a trealose (Fig. 10).



Maltose

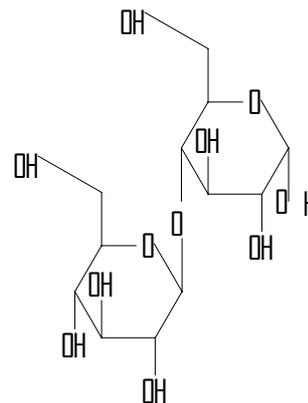
Alfa-D-Glicopiranosse-(1→4)-D-Glicose

Fig. 7- Estrutura molecular da Maltose



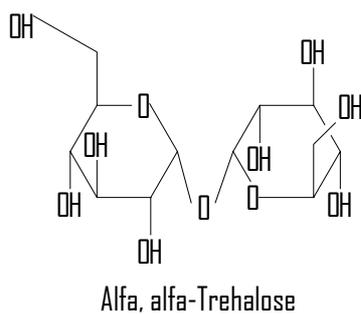
Melibiose
Alfa-D-Galactopiranosose-(1 → 6)-D-Glicose

Fig. 8- Estrutura molecular da Melibiose

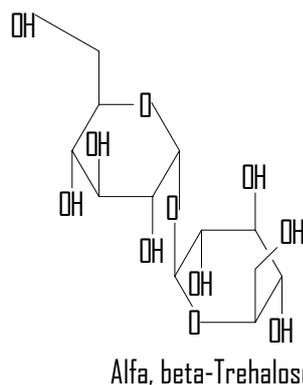


Celobiose
Beta-D-Glicopiranosose-(1 → 4)-D-Glicose

Fig. 9- Estrutura molecular da Celobiose



Alfa, alfa-Trehalose
Alfa-D-Glicopiranosose-(1 ↔ 1)-alfa-D-Glicopiranosose



Alfa, beta-Trehalose
Alfa-D-Glicopiranosose-(1 ↔ 1)-beta-D-Glicopiranosose

Fig. 10- Estrutura molecular da (α, α) e (α, β) Trealose

Isto porque, diferente da maltose (Fig. 7), da melibiose (Fig. 8) e da celobiose (Fig. 9), a trealose (Fig. 10) não possui a hidroxila do carbono 1 (C1-OH) do resíduo glicopiranosil livre para se formar a ligação β-(2→1) do produto (Park *et al.*, 2003).

Atividade de frutossiltransferases na presença de sais

Em 1996, Vigants *et al.* verificaram que a adição de NaCl e KCl ao meio de cultura contendo sacarose estimulou a biossíntese de levana. A dúvida era somente o mecanismo pelo qual isso ocorria: se por ativação direta dos genes que codificam a levansacarase, aumentando sua produção; se a presença desses sais no meio

estimulava a secreção da levanassacarase; ou se o aumento na produção da levana se dava por uma ativação direta da levanassacarase (Vigants *et al.*, 1998).

Em 1998, Vigants *et al.* verificaram que o NaCl ativa diretamente a levanassacarase. O KCl ativa a enzima praticamente da mesma forma que o NaCl, e NH₄Cl e LiCl ativam menos pronunciadamente, o que permitiu que estes pesquisadores sugerissem que a levanassacarase de *Z. mobilis* 113S tem uma propriedade de enzima alostérica, principalmente com os sais de Na e K como seus ativadores heterotrópicos.

Apesar de se tratar de enzimas diferentes, as frutossiltransferases levanassacarase e inulossacarase apresentam perfis de inibição e ativação parecidos quando postas em meio contendo determinados cátions.

As atividades de transfrutosilação das levanassacarases de *Z. mobilis* e de *M. laevaniformans* são fortemente inibidas por CuSO₄, (95%) e HgCl₂ (100%) e moderadamente inibida por ZnSO₄ (50%) e AlCl₃ (22%). O FeSO₄ e os cloretos de Mg, Ca, Na, K, Mn e Co inibiram a atividade da levanassacarase em menos de 15%. A adição de EDTA, não influenciou na atividade da enzima, indicando a ausência da necessidade de íons metálicos como cofatores para a atividade da levanassacarase (Sangiliyandi, Raj & Gunasekaran, 1999; Park *et al.*, 2003).

Hijum (2003) testou a influência de vários sais na atividade de uma inulossacarase engenheirada de *Lactobacillus reuteri* e expressa em *E. coli*, com deleção de 100 aminoácidos no C-terminal. Eles afirmaram que semelhante a várias levanassacarases, essa inulossacarase teve sua atividade significativamente reduzida pelos cátions Hg⁺², Zn⁺², Cu⁺², Fe⁺², Fe⁺³ (1mM), bem como pelo EDTA. Já Mg⁺², K⁺, Na⁺ (1mM) não resultaram em efeitos significativos sobre a enzima, mas o Ca⁺² aumentou sua atividade em 30%.

3.4. Poli e Oligossacarídeos

De acordo com Kennedy & White (1983), todo carboidrato macromolecular tem sua estrutura tridimensional e os aspectos desta estrutura são classificados em estruturas primária a quaternária. A estrutura primária corresponde à identidade de todos os seus monossacarídeos, às sequências destes resíduos, aos tipos de

ligação glicosídica, às suas posições e configuração anoméricas, além de seus substituintes. Muitas cadeias, como a da levana, parecem simples, pois correspondem a sequências repetidas de monossacarídeos e ainda por serem lineares, mas têm sua complexidade devido ao número de possibilidades para o posicionamento de algum substituinte em um monossacarídeo.

As estruturas secundárias, por sua vez, são determinadas pelas orientações relativas dos componentes devido às rotações em torno de suas ligações glicosídicas. Dois ângulos de torção definem as orientações relativas entre dois resíduos de carboidrato, exceto nas ligações em que o C6 é envolvido. Nestas, existem três ângulos. Mas estas rotações são fortemente limitadas por ligações glicosídicas envolvendo grupos axiais e por resíduos contendo substituintes volumosos. Estas restrições são, portanto, a causa da relativa rigidez das cadeias polissacarídicas em solução (Kennedy & White, 1983).

As sequências repetidas na estrutura primária de polissacarídeos levam a padrões regulares na estrutura secundária que, conseqüentemente conduzem a conformações principais estericamente regulares (estrutura terciária). Por este motivo, irregularidades nestas estruturas, bem como a presença de numerosas ramificações inibem a formação da estrutura terciária. Devido à regularidade da molécula de levana, inclusive sem ramificações, a levana provavelmente apresenta estrutura terciária, o que a torna mais flexível e adaptável a diferentes meios e condições. Finalmente, seguindo a ordem de complexidade, a estrutura quaternária é tida como a maneira como as cadeias polissacarídicas se agregam (Kennedy & White, 1983).

Os Oligossacarídeos são definidos como cadeias curtas de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(2→6) (tipo levana) ou β -(2→1) (tipo inulina) (Nilsson *et al.*, 1986; Euzenat *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 2000). São formados durante a síntese dos respectivos polissacarídeos, pela atividade de glicosiltransferases, como a da levanassacarase que transfere o grupo β -frutofuranosil da sacarose de uma maneira irreversível, para sítios carbinóis de determinados aceptores. A transfrutossilação mediada pela levanassacarase pode ser polirrepetitiva, originando macropolímeros como a levana, ou oligorrepetitiva,

resultando na formação dos oligossacarídeos (Hestrin *et al*, 1956). Estes são, na verdade, frutooligossacarídeos (FOS), pois tanto o oligossacarídeo tipo levana quanto o tipo inulina são formados por unidades de frutose, e diferem entre si apenas no tipo de ligação.

São encontrados na literatura mais de um termo (frutooligossacarídeos, frutoligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos, oligofrutose ou oligofrutosídeos) para designar as mesmas substâncias: cadeias curtas de frutose unidas por ligações glicosídicas que podem ser do tipo β -(2 \rightarrow 1) ou β -(2 \rightarrow 6).

Alguns autores tentam diferenciar os tipos de oligossacarídeos denominados de maneira diferente, como Biedrzycka & Bielecka (2004), que consideram FOS moléculas com ligações glicosídicas do tipo β -(2 \rightarrow 1) com apenas 2 a 4 unidades de frutose produzidos por transfrutossilacção da sacarose, e oligofrutosídeos aqueles com DP de 2 a 9 produzidos por degradação ou hidrólise enzimática da inulina por endoglicosidases. Considera inulina moléculas com 10 a 60 unidades, mas com apenas 10 unidades a molécula ainda parece muito curta para ser considerada polissacarídeo e as cadeias compostas por mais de 60 unidades ficariam sem denominação se estas definições fossem aceitas. Enfim, são definições não aplicadas e questionáveis por restringirem excessivamente os tipos moleculares designados por cada termo. Antes de diferenciar estas pequenas moléculas baseando-se na forma de obtenção, teria que ser considerada a presença ou não de ramificações, por exemplo.

No que se refere ao tamanho das cadeias dos oligossacarídeos, não há um consenso sobre o número de unidades que as compõem. Há autores se referindo a 2 a 9 unidades (Wang & Fang, 2004; Bornet *et al*, 2002), 3 a 12 unidades (Yun, 1996) e até 3 a 5 unidades (Biedrzycka & Bielecka, 2004). A maior variação relatada foi de 2 a 30 unidades monossacarídicas (Simon, 1996; Gibson, 2004-A), e “FOS de cadeia curta” são os que possuem cadeias com até 5 unidades monoméricas (Bornet, 2002 e Bouhnik *et al.*, 1998).

FOS de cadeia curta são produzidos atualmente em escala industrial por dois diferentes processos: a partir da sacarose, usando uma frutotransferase fúngica de grau alimentício (ACTILIGHT®, indústrias Beghin Meiji, Neuilly-sur-Seine, França) e por hidrólise parcial de inulina (Orafti, Tienen, Belgium) (Schwab & Gänzle, 2006)

3.5. Propriedades benéficas dos oligossacarídeos

A grande maioria dos estudos sobre propriedades benéficas dos FOS quando adicionados à dieta, referem-se aos FOS tipo inulina, certamente por estes serem provenientes de fontes vegetais, que sempre fizeram parte da dieta natural dos humanos. Assim, nada mais previsível que estes FOS tenham sido descobertos como benéficos antes e, por isso, terem sido muito mais estudados sob estes aspectos que os FOS tipo levana, de origem microbiana.

Por causa da β -configuração do C2 anomérico em seus monômeros de frutose, os frutooligossacarídeos são resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas de humanos (α -glicosidase, maltase-isomaltase, sacarase) específicas para ligações α -glicosídicas e, portanto, não são utilizados como fonte de energia pelo organismo quando ingeridos (Roberfroid, 2000; Van der Meulen *et al*, 2004). Quando foram injetados intravenosamente em ratos, os FOS de cadeia curta foram rapidamente excretados na urina sem degradação, sugerindo mais uma vez o seu não aproveitamento como fonte de energia pelo organismo (Bornet *et al*, 2002). Também não são cariogênicos, por não serem utilizados por bactérias que causam cáries, e seu sabor doce é muito similar ao da sacarose, um adoçante tradicional (YUN, 1996; Bornet *et al*, 2002). Estas características justificam o seu potencial para serem usados como adoçantes, principalmente por diabéticos.

Os frutooligossacarídeos formam cristais finos e brancos, são altamente higroscópicos, a viscosidade de sua solução é mais alta que a de uma solução de sacarose na mesma concentração e apresentam uma estabilidade térmica igualmente superior à da sacarose. Além disso, são altamente estáveis na faixa de pH normal dos alimentos (4,0- 7,0) e temperaturas de até 130°C, à temperatura refrigerada superam um ano de durabilidade e não levam a reações de Maillard (Yun, 1996; Bornet *et al*, 2002).

Um alimento natural pode ser genuinamente "funcional" se contiver componentes alimentares que modulam funções no corpo que são relevantes à saúde. Inulina e FOS tipo inulina são derivados de fontes vegetais. Destes, foram separados três tipos de produtos: Raftiline, com DP de 2 a 60 ou mais, é a própria inulina, sem fracionamento; Raftilose, oligofrutose produzida por hidrólise parcial enzimática da inulina, com DP<10; Raftiline HP ou de alta performance, que é a

inulina cujos oligômeros de baixo peso molecular foram eliminados (Roberfroid, 1999; Van der Meulen *et al*, 2004).

Os frutooligossacarídeos são considerados componentes alimentares polifuncionais devido a inúmeras propriedades benéficas. Estes carboidratos são comprovadamente “prebióticos”, uma vez que são ingredientes alimentares não digestíveis, e que afetam benéficamente o hospedeiro pela seletiva estimulação do crescimento e/ou atividade de um ou um limitado número de bactérias no cólon. Em especial, afetam as dos gêneros bacterianos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, mantendo o equilíbrio da microflora e afastando a colonização e crescimento de microrganismos patogênicos. (Yun, 1996; Roberfroid, 1997; Marx *et al*, 2000; Roberfroid, 2000; Van der Meulen, 2004).

Os prebióticos reconhecidos são constituídos primariamente por glicose, galactose, xilose, e frutose, não sendo conhecido até então o potencial prebiótico de oligossacarídeos compostos de outros monossacarídeos (Gibson, 2004-A).

Probióticos, por sua vez, podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em certa quantidade, exercem benefícios adicionais à saúde inerentes à nutrição básica (Van der Meulen *et al*, 2004).

Dentre as bactérias potencialmente “probióticas”, os gêneros mais citados e estudados são *Lactobacillus* e, principalmente, *Bifidobacterium*. Segundo Marx *et al*. (2000) e Roberfroid (2000), a principal propriedade promotora de saúde das bactérias deste último gênero é a produção de SCFA (“short-chain fatty acids” - ácidos graxos de cadeia curta), principalmente butirato, acetato e lactato, durante a fermentação, que limitam o crescimento de bactérias putrefativas e patogênicas, além de ser uma importante fonte de energia para elas mesmas. As referidas bactérias, potencialmente probióticas, e outras como *Streptococcus thermophilus* têm também sido adicionadas a produtos alimentícios com o intuito de promover ou melhorar o equilíbrio da flora intestinal de seus consumidores. Se os FOS estimulam seletivamente o crescimento e a atividade destas bactérias, eles podem ser considerados responsáveis indiretos pelos benefícios que estes ácidos graxos podem trazer à saúde do hospedeiro.

Os metabólitos das bifidobactérias e lactobacilos como os ácidos excretados podem reduzir o pH intestinal a níveis abaixo dos que os patógenos são capazes de

competir. Outros metabólitos, excretados por muitos lactobacilos e muitas espécies de bifidobactérias são antibióticos naturais, que podem apresentar atividades de amplo espectro (Gibson, 2004-A).

O tipo de ligação glicosídica é um fator crucial na determinação da seletividade da fermentação e da digestibilidade no intestino delgado. A fermentação dos FOS prebióticos é seletiva por causa da β -frutofuranosidase associada às células das Bifidobactérias (Gibson, 2004-A).

Bouhnik *et al.* (1998) observaram uma relação linear entre o aumento da contagem de bifidobactérias fecais e a quantidade de FOS de cadeia curta ingeridos por voluntários saudáveis, sugerindo que a concentração de bifidobactérias no cólon humano pode ser regulada por doses orais de FOS. Estes autores apontaram ainda a dose de 10g/dia de FOS de cadeia curta como ideal, pois além de bem tolerada aumenta significativamente o número de bifidobactéria no cólon de voluntários saudáveis consumindo sua dieta usual.

As bifidobactérias, porém, não são capazes de metabolizar oligossacarídeos de todos os tamanhos moleculares. Yamamoto (1999) testou o consumo de moléculas com massa molecular média de 6.000g/mol (~33 unidades) e não observou o consumo das mesmas pelas bifidobactérias. Roberfroid (2000) e Marx *et al.* (2000) afirmam serem as menores cadeias mais facilmente degradadas. Este último autor também afirma ser a metabolização de FOS espécie-dependente, uma vez que dentre as várias espécies de bifidobactérias testadas, apenas a *B. adolescentis* foi capaz de consumir tanto FOS de cadeia curta, como FOS de cadeia longa (cadeia com mais de cinco unidades de frutose). Bornet *et al* (2002) afirmaram que os FOS de cadeia curta induzem a um efeito mais potente na indução enzimática e no crescimento de Bifidus do que as frutanas de cadeia longa.

Os oligossacarídeos, bem como certos polissacarídeos, também são considerados fibras solúveis presentes na dieta, capazes de reduzir a constipação pelo aumento da viscosidade e do volume fecal, uma vez que retém água, além de reduzirem os níveis de colesterol e a glicemia (Chen *et al*, 2000; Schneeman, 1999)

Está comprovado, também, que os FOS melhoram ou protegem do câncer de cólon. O mecanismo sugerido para esta proteção que tem sido muito comumente citada, mais uma vez envolve a ação dos SCFA, principalmente o butirato, o qual,

segundo Haris & Ferguson (1999), certamente melhora a diferenciação e afeta a expressão de vários genes relacionados com o câncer em células cancerosas em cultura de tecidos. Bornet *et al* (2002) afirma que os colonócitos dependem em alto grau, da disponibilidade de SCFA provenientes da fermentação bacteriana: a oxidação do butirato tem representado mais de 70% do consumo de oxigênio pelos tecidos colônicos humanos, indicando ser o butirato a principal fonte de energia dos colonócitos, apesar de não ser a única.

Hughes e Rowland (2001) e Bornet *et al* (2002) associam os efeitos benéficos de SCFA sobre as células cancerosas de cólon com a aumentada taxa de apoptose, que foi verificada ao se administrar frutanas de chicória (com DP's médios de 4 e 25) à dieta de ratos. Segundo eles, semelhante à modulação da flora intestinal, fruto-oligossacarídeos podem exercer efeitos protetores do câncer de cólon ao nível celular, através da formação de SCFA durante o seu metabolismo bacteriano, pois estes últimos, dentre os quais se destaca o butirato, exercem uma atividade antiproliferativa em muitos tipos celulares, induzem a diferenciação, regulam a renovação celular epitelial do cólon e induzem a apoptose de células danificadas, não permitindo, portanto, que estas se transformem em células tumorais.

Células que escapam da deleção apoptótica após um tratamento com um carcinógeno, como a dimetilhidrazina, podem ter o potencial de originar tumores após um período de latência. Então, fatores que elevam a taxa de apoptose a níveis superiores aos induzidos pelos carcinógenos, podem reduzir a chance de formação do tumor (Hughes & Rowland, 2001; Hambly *et al.*, 2002).

Contrariamente ao relatado por outros autores, Strickiling *et al* (2000) avaliou os efeitos da adição de diferentes oligossacarídeos na digestão dos nutrientes e populações intestinais microbianas de cães. Para tanto, foram adicionados à dieta dos cães 5g do oligossacarídeo testado / Kg do animal e verificaram o aumento do volume fecal, porém, sem o acréscimo nas concentrações intestinais de SCFA.

Outra observação feita em relação ao consumo de FOS foi o aumento na absorção de minerais como o cálcio, o ferro e o magnésio (Roberfroid, 1997). Tem sido verificado que a melhorada absorção de magnésio tem aumentado o conteúdo deste mineral nos ossos, o que reduz os riscos de osteoporose (Bornet *et al*, 2002).

Sakai *et al* (2000) comparou os efeitos da administração de inulina e de seus oligossacarídeos de cadeia curta em ratos com anemia pós-gastrectomia, procedimento realizado em tratamentos cirúrgicos de úlceras peptídicas e câncer de estômago. A anemia pós-gastrectomia se dá pela absorção deficiente de ferro e vitamina B₁₂. Autores têm afirmado que FOS de cadeia curta estimulam a absorção de minerais como Ca, Mg e Fe, o que se verifica para vários carboidratos indigestíveis e não só para FOS. O tratamento com FOS de cadeia curta promoveu um ganho significativo de massa corporal em relação aos grupos controle e tratado com inulina, além da completa recuperação da anemia pós-cirurgia, talvez devido aos tipos de ácidos orgânicos produzidos a partir de cada um destes carboidratos por fermentação microbiana no ceco e envolvendo a mudança no pH cecal.

Segundo Ohta *et al* (1998), este efeito estimulante da absorção de carboidratos indigeríveis na absorção de minerais tem sido atribuído à influência na osmolaridade do conteúdo intestinal, o qual pode variar de acordo com o tamanho da cadeia do FOS ingerido, mas estes autores admitem não ser esta a principal razão para o efeito estimulatório na absorção de minerais.

Sakai *et al* (2000) afirma que o tamanho molecular dos carboidratos não digeríveis afeta sua fermentabilidade, e grandes moléculas tendem a desaparecer mais lentamente do que pequenas moléculas, assim como os ácidos orgânicos são produzidos mais lentamente quando moléculas maiores são fornecidas. A produção de ácidos orgânicos reduz o pH luminal, que facilita a dissolução de minerais insolúveis em água.

O ferro é absorvido na forma de íon ferroso e valores ácidos de pH contribuem para que este mineral fique nesta forma, influenciando assim na sua absorção. Outra hipótese sugerida para o aumento da absorção de ferro na luz do intestino é que este processo envolve a absorção de um complexo ferro-ácido graxo, que pode atravessar a membrana. Portanto, diferenças nos tipos de ácidos graxos produzidos pela fermentação cecal, comparando FOS de cadeia curta e inulina como substratos, pode influenciar o aumento da absorção do ferro. Apesar destas hipóteses, o mecanismo do aumento da absorção do ferro pela adição de FOS de cadeia curta à dieta permanece obscuro. FOS de cadeia curta promove um efeito

mais intenso que a inulina na recuperação da anemia pós-gastrectomia em ratos (Sakai *et al*, 2000).

Com a descoberta dos benefícios dos oligossacarídeos para o seu consumidor e das suas fontes vegetais, o estudo da influência da manipulação destas fontes, bem como de seu processamento, vem complementar as informações sobre a interferência destes fatores na composição nutricional destes alimentos. L'homme *et al* (2003) afirmaram, baseados em seus dados experimentais, que o cozimento das frutas que os compõem, como maçãs e bananas, não alteram os teores do FOS 1-cestose dosado nestas, enquanto as condições submetidas pelo processamento industrial destes alimentos podem ser responsáveis por alguma modificação neste sentido.

O tempo excessivo e a temperatura de armazenamento do vegetal também interfere na composição qualitativa e quantitativa de oligossacarídeos, como foi estudado para a cebola por Benkeblia *et al* (2005), que sugeriu, baseados na observação do material estocado por seis meses, que oligômeros maiores (como os com DP 5) são mais hidrolisados pelas enzimas do que os menores (como os com DP 4) e que os FOS isômeros tipo 1,6 G-kestotetraose e 1,1,6 G-kestopentaose são preferencialmente hidrolisados, provavelmente pela afinidade das enzimas por estes isômeros ser maior que os outros presentes. Além disso, Benkeblia *et al* (2005) verificaram que a degradação destes oligômeros não é constante durante os seis meses de estocagem. Daí a importância do estudo da produção e da purificação de oligossacarídeos, para que estes possam chegar ao consumidor ou beneficiário purificado, na sua forma mais estável possível, podendo ser estocado por um período bem mais longo que seis meses.

3.6. Oligossacarídeos como agentes terapêuticos

Diferentes oligossacarídeos estão envolvidos com eventos de adesão entre diferentes tipos celulares e entre anticorpos e células e por isso são considerados drogas promissoras que se encontram em desenvolvimento. Agentes baseados em carboidratos complexos estão sendo desenvolvidos para o uso em doenças metabólicas e cardiovasculares, como vacinas contra o câncer e na liberação de

drogas (Simon, 1996). Eles apresentam muitas aplicações farmacêuticas, dentre as quais algumas podem ser citadas (Simon, 1996; Zopf & Roth, 1996; Graves *et al.*, 1998; Ukkonen *et al.*, 2000):

- Inibidores de adesinas microbianas, impedindo a ligação do microrganismo aos tecidos do hospedeiro e separando bactérias já atachadas. Estes, apesar de não agirem como bactericidas, podem melhorar a atividade antibacteriana de antibióticos, o que já foi comprovado para a bactéria *Helicobacter pylori*. A força da adesão intercelular que é mediada por ligações não covalentes entre pares proteína-carboidrato deriva, como a força de um velcro, de um grande número de pares envolvidos;
- Antagonistas de toxinas microbianas que se ligam a carboidratos expostos nas membranas de células epiteliais, como a toxina da cólera;
- Inibidores de selectinas, que são oligossacarídeos ligados a proteínas que mediam a mobilização inicial de leucócitos e o recrutamento destes para os sítios de inflamação;
- Moduladores da biossíntese de oligossacarídeos, por serem capazes de intervir na atividade de glicosiltransferases e glicosidases. Um exemplo é a acarbose (desenvolvida pela Bayer), que é um tetrassacarídeo inibidor de α -glicosidases, usado como agente antidiabetes por reduzir a degradação de carboidratos complexos da dieta, o que leva a uma baixa absorção de glicose;
- Vacinas para o câncer, uma vez que células cancerosas exibem antígenos de superfície, imunologicamente detectáveis, que são fortes candidatos ao desenvolvimento de vacinas, como, por exemplo, a mucina MUC-1, uma glicoproteína integral de membrana expressa por muitos, se não todos os epitélios, com uma massa molecular variando entre 250 e 1000 KDa.

Para o processamento, manipulação e demais procedimentos farmacêuticos, os oligossacarídeos de cadeia curta apresentam a vantagem de serem altamente solúveis em água e estáveis ao aquecimento e a álcoois. Eles podem, inclusive, ser submetidos à fervura a pH neutro sem redução de sua atividade, o que possibilita, portanto, sua esterilização (Zopf & Roth, 1996).

O desenvolvimento farmacêutico requer tecnologia de produção, que possa fornecer grandes quantidades da droga a um custo acessível. A síntese química de carboidratos é muito complexa, pois estes produtos requerem múltiplas variações estéreo e regioespecífias, na presença de múltiplas hidroxilas de reatividades similares, o que praticamente impossibilita sua síntese química. A síntese enzimática, por sua vez, surge como a solução para estes empecilhos, uma vez que supera estas dificuldades da síntese química devido à especificidade e eficiência das glicosiltransferases (Simon, 1996).

Muitas formas ativadas de açúcares não são encontradas na natureza, o que não impede de se obtê-las por semi-síntese, pois, como tem sido verificado, muitas destas formas ativadas são aceitas como substratos pelas glicosiltransferases, possibilitando o uso da tecnologia enzimática também na síntese de oligossacarídeos não naturais (Simon, 1996).

Assim sendo, novas tecnologias e a otimização destas para cada vez mais melhorar a produção de oligossacarídeos não só encoraja a pesquisa de suas atividades como também dá subsídios para que suas promissoras atividades possam beneficiar o maior número de pessoas possível, que deve ser o objetivo de toda pesquisa científica.

Oligossacarídeos são candidatos promissores para a prevenção e tratamento de infecções como agentes antiadesivos. Um exemplo é o 3'-sialyllacto-N-neotetraose (NE-1530), um pentassacarídeo que ocorre naturalmente no leite materno que, comprovadamente, inibe a ligação de *S. pneumoniae* e *H. influenzae* a células do epitélio respiratório. Este oligossacarídeo, apesar de ter sido bem tolerado e surtido o efeito desejado na primeira fase de estudos clínicos, não mostrou um efeito benéfico na ocorrência de otite aguda média quando administrado intranasalmente para a profilaxia deste mal em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo em crianças. Segundo os autores da pesquisa, isso ocorreu pela formulação ter sido, provavelmente exposta inadequadamente aos componentes da nasofaringe, em solução de 20mmol/L, que teria sido diluída muitas vezes na mucosa nasal, principalmente em crianças com rinite (Ukkonen *et al.*, 2000).

3.7. Separação de poli e oligossacarídeos

3.7.1. Separação pela adição de não-solventes

A recuperação de polímeros é largamente utilizada por precipitação pela adição de não-solventes. Não-solventes são, freqüentemente, solventes orgânicos miscíveis em água como acetona, metanol e etanol (Belter *et al*, 1988) em que o produto a ser recuperado não é solúvel, e são capazes de insolubilizá-lo quando adicionados à sua solução aquosa.

A precipitação pela adição de não-solventes, como o etanol, também é aplicada para o fracionamento de polímeros. O equilíbrio de fases neste sistema ternário depende da massa molecular do polissacarídeo e de como estas moléculas estão distribuídas nas fases coexistentes. Moléculas com pequenas massas moleculares têm uma alta solubilidade neste sistema e permanecem no sobrenadante. E moléculas com elevada massa molecular têm uma forte tendência a passar para a fase da base (Neuchl & Mersmann, 1994).

A recuperação de polissacarídeos como a levana de um meio aquoso é satisfatoriamente realizada pela adição de não-solventes, como etanol e acetona. Dependendo da quantidade adicionada do não-solvente, pode-se selecionar a faixa de peso molecular do polissacarídeo a ser precipitada. É a chamada precipitação fracionada. Porém, há um limite para a purificação destes produtos de fermentação pela adição de não-solventes. As moléculas na faixa dos oligossacarídeos permanecem no sobrenadante e não se consegue recuperá-las completamente.

3.7.2. Separação em um sistema de partição em três fases

A técnica de partição em três fases foi primeiro relatada por Tan & Louvrien, em 1972 como um método de upstream para o isolamento de celulasas de extratos brutos. Eles provaram ser esta uma forma rápida e fácil de enriquecimento de proteínas a partir de uma mistura complexa de materiais de naturezas variadas, usando apenas alguns simples componentes como t-butanol, sulfato de amônio e

água (Borbás *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 1998). Consiste na adição de sal (geralmente o sulfato de amônio) e um solvente orgânico (geralmente t-butanol) à solução da proteína ou do polissacarídeo. Estes então aparecem, parcialmente purificados, como uma interface insolúvel entre a fase orgânica superior e a fase aquosa inferior. A alta concentração de sais na fase aquosa aumenta a sua densidade e o t-butanol aumenta a flutuabilidade do precipitado (Mondal *et al.*, 2004 e Dennison & Louvrien, 1997).

O butanol terciário é, em geral, completamente miscível em água, mas ao se adicionar uma grande quantidade de um sal como o sulfato de amônio, a solução se separa em duas fases: a fase aquosa densa e a fase leve, do t-butanol. E quando uma proteína ou um polissacarídeo está presente, a fase aquosa original pode, dependendo da concentração do sulfato de amônio, se separar em uma terceira fase, que se localiza entre as outras duas fases: aquosa e orgânica (Dennison & Louvrien, 1997).

O sulfato de amônio é largamente utilizado como agente precipitante na química de proteínas. Eletrólitos são capazes de reduzir a repulsão eletrostática de duas macromoléculas como as proteínas, por exemplo, como resultado de uma blindagem eletrostática e ligação aos grupos carregados da proteína, além de mudarem a estruturação das moléculas de água em torno do soluto. Isto resulta na redução do raio hidrodinâmico das proteínas e os efeitos acima podem ser significantes para tornar as proteínas insolúveis ou agregadas na lâmina interfacial (Borbás *et al.*, 2003).

Dependendo da concentração e da carga da macromolécula, é possível que vários fatores como fortes efeitos iônicos, estresse osmótico (desidratação) e outros, ou uma mistura deles operando em várias proporções, sejam responsáveis pela expulsão das macromoléculas da solução aquosa. Porém, a característica mais citada deste sal para justificar esta sua ação, segundo Dennison & Louvrien (1997), é a cosmotropia.

Um cosmotrópico é um chamado gerador de ordem, por organizar as moléculas de água em cápsulas de solvatação. Estas substâncias podem modificar a extensão e a força da ligação de hidrogênio e são consideradas geradores de

ordem. Além disso, seus efeitos na extensão e na qualidade da ligação de hidrogênio tornam a água menos densa (Chaplin, 2006).

O sulfato e o t-butanol são cosmotrópicos. Os cosmotrópicos iônicos são tratados diferentemente dos não-iônicos, devido, principalmente aos arranjos direcionados e polarizados das moléculas de água circundantes. Os cosmotrópicos iônicos têm alta densidade de carga (são pequenos e multicarregados, como SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , e outros). Suas interações com as moléculas de água são mais fortes que as existentes entre elas mesmas e, por isso, são capazes de quebrar ligações de hidrogênio água-água. Como cosmotrópicos iônicos executam primariamente sua estruturação com sua cápsula de hidratação, eles particionam a água em uma forma mais densa, onde podem obter sua hidratação mais facilmente (Chaplin, 2006).

Cosmotrópicos não-íonicos são moléculas muito solúveis e bem hidratadas, com pouca tendência a agregação. Não têm carga estabelecida e ligam-se muito fortemente à água, o que estabiliza a estrutura de macromoléculas em solução. São preferencialmente solubilizadas no íntimo da solução e excluídas das lâminas de solvatação de superfícies macromoleculares. Consequentemente, elas reduzem a difusão da água em torno de proteínas e mudam a taxa de prótons amida na cadeia principal. Isto leva a desidratação destas superfícies e assegura uma menor flexibilidade da macromolécula, o que acarreta uma maior estabilidade térmica, porém com redução da atividade de enzimas. Cosmotrópicos reduzem o volume de água disponível para hidratar a maior superfície exposta por proteínas desnaturadas, tendendo então a prevenir o processo de desnaturação (Chaplin, 2006).

Apesar de existirem muitos outros cosmotrópicos iônicos, a preferência é decisivamente do sulfato de amônio para TPP por causa da hidratação e cosmotropicidade apresentada pelo íon sulfato em concentrações acima de 0,4M. Apesar de outros sais apresentarem similares intensidades de força iônica, nenhum se aproxima do sulfato de amônio na TPP nem na usual técnica de “salting-out”, especialmente com macromoléculas que apresentam mobilidade conformacional, apesar da força iônica. O fosfato divalente é um excelente cosmotrópico e, por isso, poderia se esperar que pudesse ser tão utilizado para esse tipo de biosseparação como o sulfato, mas é limitado pelo pH, uma vez que o SO_4^{2-} permanece divalente em todos pHs acima de 2,1 e o fosfato somente em valores acima de 7,2. Abaixo

deste pH, o fosfato está predominantemente na forma monovalente (H_2PO_4^-) e suas propriedades como cosmotrópico são praticamente extintas, enquanto o sulfato permanece completamente efetivo (Dennison & Louvrien, 1997).

3.7.2.1. *Comparação do sistema de TPP com outros métodos de purificação*

Segundo Kiss *et al.* (1998), Borbás *et al.* (2001) e Kiss & Borbás (2003), o sistema de partição em três fases pode ser interpretado como uma combinação especial de “salting-out” e precipitação alcoólica, com várias vantagens. TPP é simples e rápido, pode ser realizado à temperatura ambiente, as substâncias utilizadas podem ser recicladas, pode-se facilmente aumentar a escala, não usa polímeros que precisam ser removidos posteriormente, além disso o t-butanol tem um alto ponto de ebulição, o que o torna menos inflamável do que o etanol e o metanol.

Dennison & Louvrien (1997) consideram que a técnica de TPP é vantajosa sobre outros métodos usados, sob vários aspectos:

- Em relação à precipitação pelo etanol gelado, a TPP é prática para o uso à temperatura ambiente e, às vezes, mais alta, quando a separação pode se dar mais rapidamente, ou também quando se deseja uma desnaturação seletiva de proteínas contaminantes.
- Em relação a sistemas de partição em duas fases usando polímeros como a dextrana e o polietilenoglicol (PEG), a TPP é vantajosa pela maior facilidade de recolhimento do precipitado macromolecular desejado e posterior eliminação de resquícios de t-butanol, e sulfato de amônio (separado por diálise), em relação à dificuldade de livrar a macromolécula alvo do polímero usado para extrai-la do meio aquoso. É vantajosa também por precipitar a macromolécula desejada de uma forma marcadamente mais concentrada.
- E diferindo da cromatografia, a TPP se apresenta compatível com larga escala. E apesar de não ter o poder de resolução deste método, a TPP pode ser aplicada em etapas de downstream, preconcentrando a macromolécula desejada e eliminando outras para subseqüentes etapas de cromatografia ou outros procedimentos de downstream. A

TPP também pode ser usada como uma etapa pós cromatográfica, uma vez que este último método tende a diluir enquanto a TPP reduz rapidamente o volume da fração cromatográfica em que se encontra a molécula desejada (Dennison & Louvrien, 1997).

O sistema de TPP permite adaptações às diferentes necessidades de separação. Um exemplo é o de Roy & Gupta (2002), que adicionaram os íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} na tentativa de tornar o sistema de TPP mais seletivo, associando esta técnica à de afinidade por metais (inspirado na cromatografia por afinidade) para a purificação de uma proteína classicamente purificada por cromatografia. Desta forma, eles obtiveram uma ótima recuperação com a maior concentração de sulfato de amônio testada e uma seletividade realmente melhorada em relação à TPP simples.

Szamos & Kiss (1995) testaram a influência da tensão interfacial e da densidade da fase líquida como possíveis marcadores do processo de precipitação de proteínas em TPP, e testaram outros sais além do sulfato de amônio.

Quanto à densidade da fase aquosa, Szamos & Kiss (1995) relataram, baseados em suas observações experimentais, que este parâmetro tem uma profunda influência na quantidade de material absorvente formando a fase do meio e sugeriram a existência de um complexo solvente orgânico/proteínas localizado na interface entre as fases orgânica e aquosa devido à aumentada hidrofobicidade da superfície, bem como a sua reduzida densidade.

Os valores de tensão interfacial indicam a extensão da diferença da composição das fases leve e pesada quando atingem o equilíbrio. Assim sendo, altos valores de tensão interfacial refletem grandes diferenças de polaridade entre as fases nos sistemas estudados. Confirmando isso, Szamos & Kiss (1995) verificaram que a partição do material absorvente de luz UV mostra uma dependência da tensão interfacial dos respectivos sistema, uma vez que para os sais testados, quanto maior a tensão interfacial verificada nos sistemas, maior a concentração de material absorvente na fase do meio.

Após a mistura dos componentes do sistema, este tende a uma estabilização com gradual formação da lâmina interfacial. O tempo necessário para esta estabilização, que é o mesmo necessário para que os valores de viscosidade e

elasticidade possam ser mensuráveis, é chamado de fase lag. E a duração desta fase é influenciada pela forma e intensidade que se faz a mistura dos componentes, da concentração da proteína adicionada ao sistema, e também pela tensão interfacial do mesmo (Borbás *et al.*, 2003; Kiss & Borbás, 2003).

3.7.2.2. *Composição das fases no sistema de TPP*

A fase leve, orgânica, contém muito álcool e muita água, com sulfato de amônio somente em traços. A fase densa é uma solução aquosa do eletrólito com um baixo conteúdo de t-butanol. A tensão interfacial entre as duas fases líquidas é baixa, geralmente em torno de $1-6\text{mNm}^{-1}$, dependendo da proporção dos componentes do sistema (Borbás *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 1998; Borbás *et al.*, 2003; Kiss & Borbás, 2003).

A composição da fase do meio depende do soluto. Borbás *et al.* (2001) estudaram a composição e o comportamento mecânico da fase do meio gelatinosa em diferentes sistemas, usando duas proteínas modelo. A fase do meio, gel protéico, usualmente contém uma elevada quantidade de líquido mesmo após a compressão centrífuga (80-95% m/m). A concentração protéica e de sulfato de amônio diferiram entre as lâminas formadas nos sistemas com as proteínas testadas. Em relação aos diferentes sistemas testados, estas diferenças não foram significantes ao ponto de se poder correlacioná-las à composição inicial do sistema.

Kiss *et al.* (1998), objetivando esclarecer o papel dos fatores que afetam o processo de TPP, como a composição do sistema e a concentração e o caráter do soluto, traçou um diagrama de fases usando água/sulfato de amônio/t-butanol a 25°C (Fig. 11). A partir das informações fornecidas por este diagrama, realizou novos experimentos e correlacionou o comprimento das linhas de amarração traçadas com a tensão interfacial e a eficiência da partição e formação da lâmina interfacial.

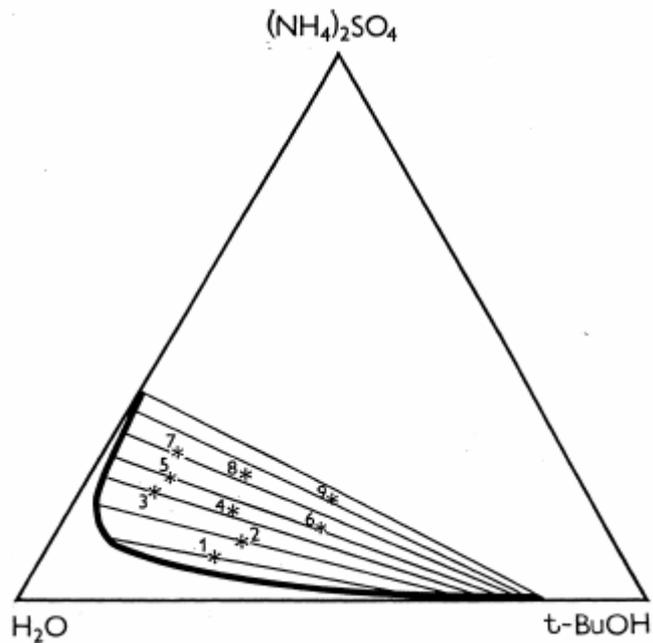


Fig.11-Diagrama de fases (em proporção de massa) do sistema de três componentes água/sulfato de amônio/t-butanol a 25°C (Kiss, *et al.*, 1998)

A área próxima ao ângulo da água representa uma única fase líquida, a área em que se encontram as linhas de amarração representa a presença de duas fases líquidas imiscíveis, e a área acima desta última representa a que um excesso de sal está presente na forma sólida (Fig. 11). A separação de fases pode ser induzida tanto pelo aumento da quantidade de sal como pelo da quantidade de t-butanol. As composições das fases de base e de topo, ou melhor, os pontos finais das linhas de amarração, indicam que ambas as fases contêm os três componentes, mas em diferentes proporções. Quanto mais longas as linhas de amarração, maiores são as diferenças entre as composições das duas fases e segundo Kiss *et al.* (1998), esta relação é também refletida nos valores de tensão interfacial entre as mesmas.

Depois de testar vários sistemas, com composições correspondendo aos pontos escolhidos em cada uma das linhas de amarração traçadas no diagrama, Kiss *et al.* (1998) verificaram que o comprimento da linha de amarração é um fiel indicador da efetividade do sistema de partição e que esta correlação permite a escolha da composição do sistema de partição com a desejada efetividade. Ao longo de uma dada linha de amarração, várias composições iniciais do sistema de partição resultam num equilíbrio líquido de fases com a mesma composição. Portanto, o

mesmo acúmulo do desejado soluto pode ser obtido com vários sistemas e a composição apropriada para uma dada tarefa pode ser selecionada considerando-se aspectos econômicos, por exemplo.

Kiss *et al.* (1998) verificaram também que a proporção dos solutos testados que migra para a fase intermediária, em relação à quantidade total, não depende da sua concentração inicial no sistema. A constante efetividade no acúmulo do soluto na lâmina interfacial, bem como a correlação entre os efeitos do sal e do solvente orgânico suporta o caráter de partição e sugere um mecanismo diferente do que ocorre na técnica de *salting-out*. Além disso, a aplicação sucessiva de dois processos de TPP também resulta na formação de uma lâmina na segunda etapa, caracterizada pela mesma taxa de partição medida no primeiro processo.

Segundo Kiss *et al.* (1998), a adsorção interfacial do soluto provavelmente é seguida pela sua precipitação interfacial no sistema e o alto grau de precipitação interfacial pode ser explicado pelo fato da área de interface ser grandemente aumentada devido a baixa tensão interfacial ($1-5 \text{ mNm}^{-1}$) durante a mistura vigorosa. A aparência, o tamanho e a estrutura da lâmina interfacial também é informativa e pode ser usada para diferenciar amostras com proteínas em solução.

Borbás *et al.* (2001) afirmaram também que a fase do meio gelatinosa não é uma fase líquida homogênea, e sugeriram que a fase do meio em TPP se tratava de uma emulsão, estabilizada por uma rede proteica, um gel denominado emulsão gel, que é composto de gotículas, encobertas por proteínas adsorvidas em sua superfície.

As condições usadas na TPP permitem a formação de conexões físicas entre os elementos da rede que interagem na interface líquido/líquido dos sistemas de TPP, comprovadas pelas observações ópticas, que indicam que estes géis não são transparentes. O estágio de emulsificação é um aspecto crucial durante a formação da lâmina, atestado pelo caráter viscoelástico dos finos filmes protéicos (Borbás *et al.*, 2001; Borbás *et al.*, 2003).

A partição das proteínas testadas se deu entre seus dois estados: solvatada na fase aquosa e adsorvida na interface líquido-líquido, desdobrada pela emulsificação. Estas mudanças conformacionais ocorrem durante a adsorção das proteínas na interface (Murray, 1997 apud. Borbás *et al.*, 2001). Durante essa

adsorção, as moléculas que se encontram formando um filme protéico se expandem consideravelmente na interface líquido-líquido e acabam por aumentar a extensão de seu desdobramento. Isso aumenta a estabilidade da emulsão e, segundo Borbás *et al.* (2001), quanto mais flexível for a proteína ou outro soluto, espera-se que o desdobramento se dê mais rapidamente, resultando em uma maior capacidade de retenção de líquido e na formação de um gel mais flexível em TPP.

Partindo de todas as informações obtidas em 2001, Borbás *et al.* sugeriram um provável mecanismo para a formação do gel: quando as duas fases líquidas imiscíveis são misturadas, a adsorção interfacial da proteína ocorre estabilizando a emulsão destas duas fases. Após a estabilização do sistema, dois processos ocorrem: a coalescência das gotículas da emulsão e a parcial ou total desnaturação das proteínas, que causam uma rigidez do filme interfacial e aumenta a barreira à coalescência. Estas etapas resultam em um sistema composto de três fases: a fase do meio é uma emulsão concentrada, estabilizada pelas proteínas adsorvidas na superfície, e as outras duas fases líquidas que emergiram da parcial quebra da emulsão.

Borbás *et al.* (2003) acompanharam a formação da lâmina interfacial com BSA por microscopia e puderam verificar o aumento do número de bolhas, a redução da mobilidade e posterior agregação e coalescência das mesmas na lâmina do meio, formando uma camada semelhante a um creme. Era a acomodação, ou a estabilização da emulsão formada pela mistura dos componentes do sistema e a proteína.

Parâmetros físico-químicos da lâmina interfacial têm sido correlacionados com sucesso à eficiência de separação de proteínas por TPP. Borbás *et al.* (2003) mediram a elasticidade e a viscosidade das lâminas formadas em sistemas aplicados a diferentes tipos de proteínas em diferentes concentrações. Segundo estes autores, as taxas de crescimento da elasticidade e da viscosidade interfacial indicam a evolução do processo dinâmico na interface, que inclui adsorção, desdobramento, rearranjo molecular, enredamento, ligações cruzadas, etc.

A dinâmica do processo de formação da lâmina interfacial parece estar relacionada com o seu conteúdo de sal. Quando o conteúdo de sal no sistema foi reduzido nos experimentos de Borbás *et al.* (2003), foram encontrados valores de

viscosidade e elasticidade praticamente fixos e os processos dinâmicos aparentemente cessaram. Mas quando o conteúdo de sal foi alto, os parâmetros reológicos aumentaram na mesma proporção, indicando uma contínua e progressiva mudança no filme interfacial. O aumento na concentração de sal no sistema aumenta o efeito de blindagem eletrostática na repulsão inter e intramolecular que promove a associação das macromoléculas na interface, elevando as suas propriedades reológicas e podendo ser a explicação para a maior rigidez da lâmina de sistemas com mais altos conteúdos de sal.

Comparando as propriedades viscoelásticas das lâminas formadas com crescentes concentrações de proteínas, Borbás *et al.* (2003) verificaram um aumento destas propriedades até um limite. E, de acordo com estes autores, este limite na modificação das propriedades reológicas da lâmina existiu porque as maiores concentrações de proteína utilizadas estavam muito próximas da saturação.

O rendimento da separação de macromoléculas no sistema de TPP está intimamente relacionado às propriedades dilatacionais do filme protéico adsorvido. A eficácia em sistemas de TPP é largamente governada pela emulsificação e a estabilidade da emulsão em curto prazo. Enquanto considera-se que a viscoelasticidade contribui apreciavelmente para a estabilidade das emulsões em longo prazo, a deformação dilatacional é mais relevante para a estabilidade em curto prazo (Kiss & Borbás, 2003).

O sistema de partição em três fases é uma estratégia relativamente nova, embora esteja razoavelmente bem estabelecida para a separação de proteínas. Um grupo de pesquisa do Instituto indiano de Tecnologia de Hanz Khas, em Nova Delhi, Índia, tem aplicado esta técnica à separação para polissacarídeos e conseguido bons rendimentos. Sharma & Gupta (2002) estudaram a separação de polissacarídeos por um sistema de partição em três fases, obtendo mais de 80% de recuperação dos diferentes tipos de alginatos testados. Sharma *et al* (2003) estenderam a aplicação da técnica de partição em três fases à quitosana e recuperaram 88% da quitosana presente na solução inicial. Mondal *et al* (2004), por sua vez, atingiram 89% de recuperação do amido presente em uma solução aquosa usando este método e o mesmo rendimento quando substituíram o t-butanol pelo 1-

4 dioxano, e abriram as portas para se testar esta nova forma de isolamento para FOS e levanas de diferentes pesos moleculares.

O tratamento não só de enzimas, mas também de polissacarídeos pelo sistema de TPP tem resultado em modificações químicas nos referidos substratos, que, no caso de muitas enzimas, tem resultado em uma maior atividade. Para os polissacarídeos testados, como o amido e a quitosana, as modificações estruturais têm sido verificadas em espectros de infravermelho e índice de refração, pela difícil degradação por enzimas específicas, e modificações nas características de solubilidade (Mondal *et al*, 2004; Sharma *et al*, 2003). Gupta (2000) justificou estas mudanças conformacionais pela intensa redução da atividade de água, que leva à substituição das ligações de hidrogênio polissacarídeo/água por ligações inter e intramoleculares polissacarídeo/polissacarídeo (Sharma *et al*, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Zymomonas mobilis ZAG 12, identificada pelo código UFPEDA 241, pertencente a Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos, foi a bactéria utilizada para a produção de FOS e levana utilizada nos experimentos de biosseparação.

4.2. Produção de levana

O complexo levana-levanassacarase foi produzido de acordo com as condições utilizadas por Calazans (1997), Calazans *et al* (1997) e Calazans *et al* (2000) para produção de levana. O meio utilizado foi o ML (meio de produção), composto de sacarose a 200g/L, extrato de levedura a 2g/L, KH₂PO₄ a 2g/L, (NH₄)₂SO₄ a 1g/L e MgSO₄ a 0,5g/L. O pH da solução de sacarose foi ajustado para 6,5 com o auxílio do peagômetro Digimed® DM 21, antes da autoclavação, e o processo foi conduzido a 25°C, em três frascos Pyrex de 1L com 750mL de meio cada, por 48h.

4.3. Produção de FOS por via fermentativa

Para esta produção utilizou-se o mesmo meio descrito para a produção do complexo levana-levanassacarase, porém com a concentração de sacarose a 150g/L. Foram coletadas amostras do meio fermentado no tempo inicial e após 12, 24, 48 e 72 h de processo. As fermentações foram conduzidas em triplicata, em frascos de 500mL contendo 300mL de meio, sob agitação de 100rpm, concentração inicial de sacarose de 150g/L, e temperaturas de 30, 35 e 40°C em agitador/incubador Marconi® MA 830.

O perfil de distribuição dos FOS no meio fermentado foi traçado, em todas as amostras coletadas, por CLAE. Para tanto, foi utilizando o cromatógrafo HP série 1100, Fase móvel: água Milli-Q, coluna: REZEX RSO OLIGOSACCHARIDES (12µm, 10mm x 200mm), temperatura de 80°C e vazão de 0,3 mL/min.

4.4. Determinação da atividade enzimática da levanassacarase submetida a diferentes condições de reação.

Inicialmente, realizou-se uma fermentação para produção do complexo levana-levanassacarase, conforme descrito no item 4.2. O caldo fermentado foi centrifugado a 5.000rpm por 15min a 2°C, em centrífuga refrigerada JOUAN Bri® *multifunction* e filtrado a vácuo em membranas de 0,45µm, com o auxílio da bomba de vácuo Marconi® MA 058, para garantir a ausência de células. Conforme esquematizado na Fig. 12, o fermentado centrifugado foi filtrado e recolhido em três kitassatos contendo sacarose em quantidade suficiente para ajustar a concentração deste açúcar no filtrado para aproximadamente 100, 250 ou 400g/L, ao completar o volume para 480mL no interior de cada um deles. A massa de sacarose a ser adicionada a cada kitassato foi calculada com base na sacarose residual em dosagens realizadas em experimentos de Vinhas (1999).

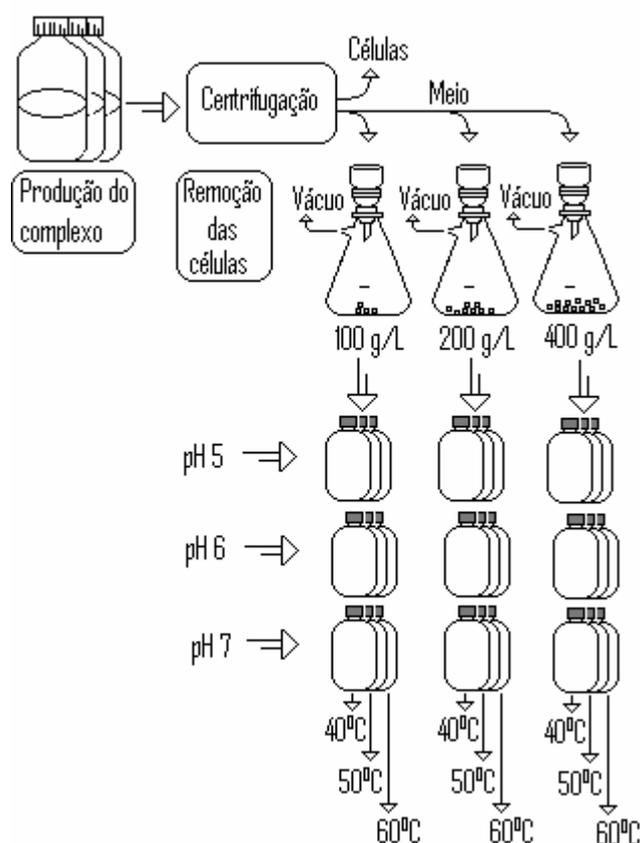


Fig. 12- Representação esquemática do procedimento seguido para o teste da atividade enzimática da levanassacarase submetida a diferentes condições de reação.

Completado o volume de 480mL e tendo-se solubilizado toda a sacarose contida em cada kitassato com o meio fermentado sem células, transferiu-se 50mL do conteúdo destes para cada um dos nove frascos de tampa rosqueada previamente esterilizados e identificados (Fig. 12). Os frascos foram separados em grupos de três e cada um destes grupos teve seu pH ajustado para 5, 6 ou 7, com o auxílio de fita indicadora (Fig. 12). Um frasco de cada grupo foi incubado a uma temperatura diferente (40, 50, ou 60°C) em banhos-maria das marcas Cientec® e Ética® previamente estabilizados, por 24h. Foram coletadas amostras nos tempos inicial e final (24h). A inativação da enzima foi feita submetendo-se os frascos a um banho à temperatura de ebulição por 15min.

Em todas as amostras a levana foi dosada por peso-seco. O sobrenadante da precipitação do polissacarídeo foi evaporado em estufa a vácuo Marconi® MA 030, a 50°C e -600mmHg. Essas condições de temperatura e pressão foram aplicadas para a evaporação de todos os sobrenadantes utilizados durante este trabalho de dissertação. Após a concentração por evaporação, as amostras sem levana foram ressolubilizadas em água destilada e transferidas, com o auxílio de pipetas Pasteur, para balões volumétricos de 5 ou 10 mL. Nelas, foram dosadas glicose, frutose e sacarose antes e depois da reação enzimática.

De posse dos dados de glicose e frutose, foi possível calcular indiretamente as atividades de hidrólise e transfrutoseilação da enzima nas diferentes condições de reação à que foi submetida (Oseguera *et al.*, 1996; Hatakeyama *et al.*, 1996; Bekers *et al.*, 2002; Sangiliyandi *et al.*, 1999; Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001; Jang *et al.*, 2001; Sunitha *et al.*, 2000):

A taxa de hidrólise (VH) foi expressa pela quantidade total de frutose ([FruT]) liberada no tempo de reação t:

$$VH = d[FruT]/dt \quad (\text{Eq 1})$$

A taxa total de conversão de sacarose (VS) foi expressa pela quantidade de glicose total ([GliT]) liberada no tempo de reação t:

$$VS = d[GliT]/dt \quad (\text{Eq 2})$$

Estequiometricamente, a quantidade de glicose equivalente à frutose transferida para um acceptor pela levanassacarase ([GliT]) corresponde à diferença entre as quantidades totais de glicose e frutose liberadas:

$$[GliT] = [GliT] - [FruT] \quad (\text{Eq 3})$$

Então, a taxa de transfrutossilacção da enzima (V_t) foi expressa pela variação na concentração de glicose liberada pela atividade de transferase [GliT] durante o tempo de reacção t , que corresponde à velocidade de transferência de moléculas de frutose para aceptores:

$$V_t = d[GliT]/dt = d[FruT]/dt \quad (\text{Eq 4})$$

Uma unidade da atividade de transferase da levanassacarase é a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol}$ de glicose ([GliT])/min sob as condições pesquisadas (Equação 4). Uma unidade da atividade de hidrolase é a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol}$ de frutose ([FruT])/min sob as condições pesquisadas (Equação 1).

A atividade total da levanassacarase (V_S) é a soma das duas atividades e a unidade é definida como a quantidade da enzima capaz de produzir $1\mu\text{mol}$ de glicose ([GliT])/min nas condições pesquisadas (Equação 2).

4.5. Teste de inativação da levanassacarase pelos reagentes dos métodos de Roe & Papadopoulos (1954) e de Miller (1959).

Inicialmente, foi realizada uma pequena produção (600mL de meio) do complexo levana-levanassacarase (Bekers *et al*, 2002), cujas condições foram: 200g/L de sacarose inicial, 25°C, por 24h, em meio ML. A biomassa crescida nessa fermentação foi usada para a construção da curva de calibração de células. O complexo por sua vez, foi recuperado por precipitação com 75% de etanol quase congelado, e o sedimento úmido usado no teste de inativação da levanassacarase. O sobrenadante da precipitação do complexo foi evaporado nas condições descritas no item 3.2, a fim de se obter os oligossacarídeos presentes para posterior utilização, em estufa a vácuo Marconi® MA 030.

Para o teste de inativação da levanassacarase pelos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954), juntaram-se volumes iguais da solução de sacarose 2M em tampão de fosfato pH 6,5 (Na_2HPO_4 a 1,76g/L e NaH_2PO_4 a 2,43g/L) e da solução do complexo levana-levanassacarase a 100g/L, no mesmo tampão. A mistura reacional foi homogeneizada e, contida em frasco com tampa para evitar evaporação da água, foi incubada a 30°C em estufa Quimis® BOD Q315D, por duas horas (Fig. 13). Foram testadas levanas preparadas de duas maneiras: recém-produzida e liofilizada. As soluções de levana foram preparadas usando-se o peso úmido do sedimento do polissacarídeo. A levana liofilizada foi antes ressolubilizada para só então ser reprecipitada e pesada nas mesmas condições (sedimento úmido) da levana recém-produzida.

Com o intuito de facilitar e agilizar a adição dos reagentes às alíquotas da mistura reacional, além de minimizar o risco de erro, os tubos a serem utilizados para as reações colorimétricas foram numerados e organizados em seis grupos. Cada grupo foi composto por três tubos, e a adição de todas as soluções e reagentes obedeceram à ordem numérica estabelecida. Para os quatro primeiros grupos foram utilizados tubos rosqueados e para o quinto e o sexto, tubos de Follin Wu, adequados a dosagens de ART pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNSA) (Miller, 1959) (Fig. 13).

A adição da mistura reacional aos tubos foi realizada com o auxílio de Pipetadores Gilson® de 10, 200 e 1000µL. As alíquotas da mistura reacional não foram transferidas para os tubos no início do tempo de reação por que consistiam em volumes pequenos o suficiente para permitir a evaporação da água e invalidação do experimento. Ao final das duas horas de reação, adicionou-se o volume de água suficiente para completar as alíquotas. Imediatamente após, adicionou-se a solução de resorcinol a 0,1% em etanol aos dois primeiros grupos, a de HCl a 30% ao terceiro e ao quarto grupos (ambos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954), para dosagem de cetoses), e o reagente de Miller (1959) ao quinto e ao sexto grupo (Fig. 13).

As reações do primeiro, do terceiro e do quinto grupos foram concluídas com a adição da solução que faltava (HCl, resorcinol e DNSA, respectivamente). Os tubos destes três grupos foram conduzidos aos respectivos banhos-maria pelo

tempo necessário (80°C por 8 min para os grupos com resorcinol e ácido, e 100°C por 5 min com posterior banho de gelo, para o grupo com reagente de DNSA), acompanhados pelo tubo com o padrão negativo e três com a solução padrão de frutose para o método de Roe & Papadopoulos (1954), e de glicose para o de Miller (1959) (Fig. 13).

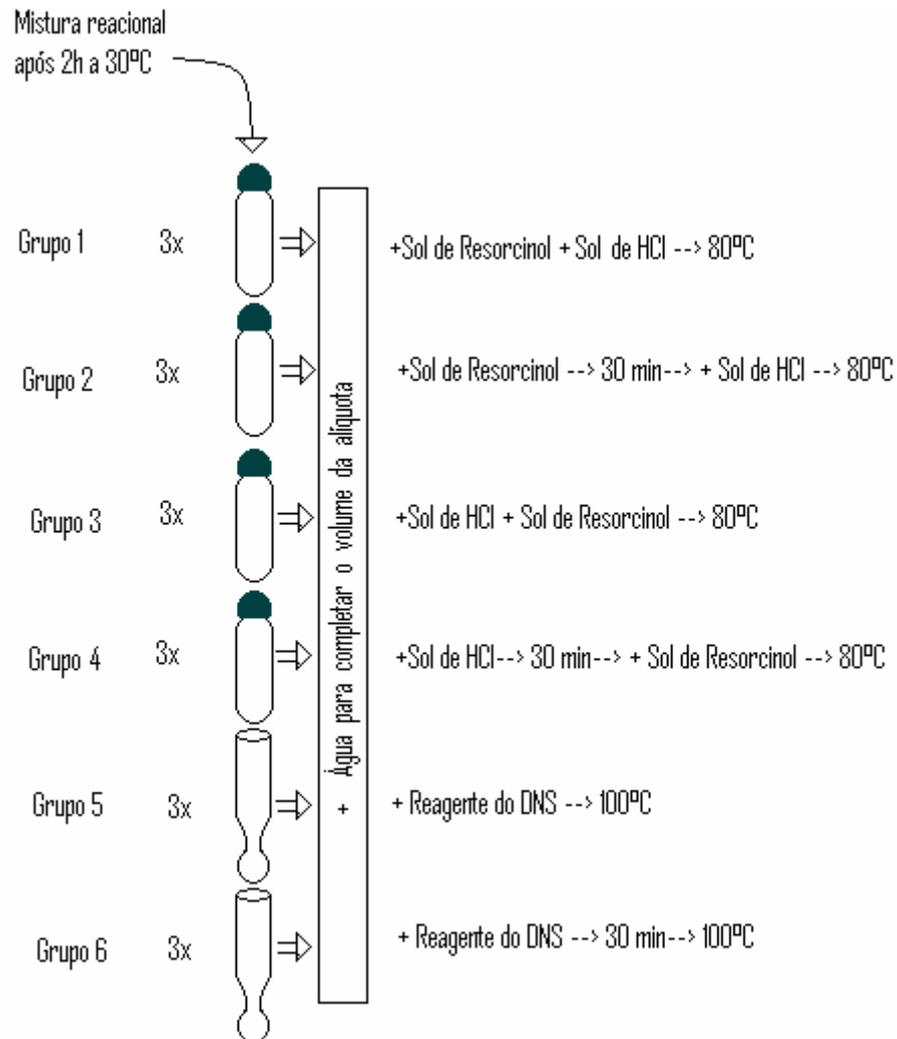


Fig. 13- Representação esquemática do método usado para a verificação da inativação da levanassacarase pelos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954) e de Miller (1959).

Os tubos do segundo, do quarto e do sexto grupos permaneceram a 30°C por mais 30 min, contados a partir do momento em que o primeiro reagente foi adicionado. Passado esse tempo, foram adicionados os reagentes que faltavam aos tubos do segundo e do quarto grupos (resorcinol e HCl, respectivamente) Os tubos

do sexto grupo foram apenas retirados do incubador. Os tubos destes grupos foram, em seguida, conduzidos ao banho-maria a 80°C acompanhados pelos tubos do padrão negativo e de três padrões de frutose para os com resorcinol, e de glicose para os com DNSA (Fig. 13).

Foram feitos ainda mais três grupos de padrões para o método de Roe & Papadopoulos (1954), que seriam da solução de levana recém produzida, de levana liofilizada e da solução de sacarose usadas na reação enzimática.

Os grupos 1, 2, 3 e 4 foram planejados para verificar se ambos ou apenas um dos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954) era capaz de inativar a levanassacarase do meio, caso esta inativação fosse evidenciada. E, se apenas um dos reagentes fosse reponsável pela inativação, qual seria. A troca das ordens de adição dos reagentes seria útil também para avaliar um possível prejuízo no método de dosagem caso a ordem fosse invertida para favorecer uma imediata inativação da enzima pelo ácido. O intervalo de 30 min após a adição de um dos reagentes foi planejada para evidenciar a não inativação da enzima em qualquer das situações criadas. 30 min era tempo suficiente para produzir diferenças perceptíveis nas concentrações dos açúcares presentes, caso a enzima não fosse inativada.

As leituras foram realizadas a 540nm para o DNSA e 530nm para o ROE, conforme indicado por cada método, em um espectrofotômetro UV/VIS Labomed®.

4.6. Biosseparação das frações leves da levana

4.6.1. Preparo das frações leves de levana

4.6.1.1. *Hidrólise da levana a tamanhos moleculares menores pelo método de De Paula (2004) modificado.*

Para tal hidrólise, utilizou-se levana liofilizada ou levana recém-precipitada. Quando se utilizou a levana liofilizada, a solução foi preparada a 100g/L. Quando se utilizou a levana recém-precipitada, a solução que seria submetida à hidrólise foi preparada a 800g/L usando-se peso úmido, ou seja, 20g do sedimento da levana recém precipitada para 25mL de solução.

A levana, seca ou úmida, foi pesada diretamente em um frasco de Bécker de 250mL com o auxílio de balança semi-analítica Marte®, e o volume de 25mL completado com água destilada, seguindo a marcação da referida vidraria. Ajustou-se o pH da solução de levana para 2,5, com o auxílio de peagômetro Digimed® DM 21, pela adição de uma ou duas gotas de HCl concentrado e demais ajustes com soluções de NaOH a 40 ou 4%, e HCl 0,1M.

Em seguida, preparou-se o banho-maria utilizando-se um segundo frasco de Bécker, de 600mL, com uma base de aproximadamente 1cm de altura em seu interior, para o frasco de Bécker menor. Colocou-se o frasco de Bécker menor no banho sobre o suporte de 1cm e ajustou-se o volume da água do banho de forma que estivesse em quantidade suficiente apenas para atingir a marca de 50mL do frasco de Bécker de 250mL. Utilizou-se um vidro de relógio para proteger o Bécker de 250mL quanto à excessiva evaporação de seu conteúdo e procedeu-se à hidrólise em aparelho de microondas White-Westinghouse® ou Panasonic® *Pícolo* à potência máxima, por 3min e 30seg.

Após a etapa em microondas, esfriou-se a solução em geladeira e procedeu-se à sua neutralização utilizando-se o mesmo peagômetro e as mesmas soluções ácidas e alcalinas citadas anteriormente.

4.6.1.2. *Fracionamento da levana hidrolisada pelo método de Calazans et al (2000), modificado por De Paula (2004).*

A solução de levana hidrolisada foi fracionada após sua transferência para um copo de centrifuga com capacidade para aproximadamente 400mL, previamente pesado. O fracionamento foi realizado adicionando-se à solução de levana hidrolisada massas de etanol absoluto quase congelado suficientes para atingir as concentrações seqüenciais de 60, 70, 80 e 90% (m/m). Cada fração precipitada foi separada do sobrenadante que continha as frações de menor peso molecular por centrifugação a 4°C e 10000rpm por 25min em centrífuga refrigerada Sorvall® *Super T21*. O sobrenadante da fração mais leve (90%) foi evaporado em estufa a vácuo Marconi® MA 030 a 50°C e pressão de -600mmHg, ao menor volume possível. E o concentrado obtido era, como as demais frações de levana precipitadas, transferido para vidraria adequada e liofilizado.

As frações obtidas desta maneira foram denominadas como segue:

F 60: fração precipitada pela adição de etanol até que se atingisse a concentração de 60% (m/m). Como as frações mais pesadas (10 a 50%) não haviam sido retiradas anteriormente, esta compunha um conjunto das frações pesadas precipitáveis com concentrações menores ou igual a 60% (m/m) de etanol.

F-70, F-80 e F-90: frações que continham levana nas faixas de peso molecular precipitáveis pelas concentrações de etanol de 70, 80 e 90%, respectivamente. Ou seja, a F-70 contém levana com peso molecular na faixa precipitável com concentrações maiores que 60, e menores ou iguais a 70% de etanol). Mas não contém as moléculas maiores, precipitáveis com até 60% de etanol, que já haviam sido retiradas da solução anteriormente.

F>90: todos os tamanhos moleculares provenientes da hidrólise da levana com pesos moleculares inferiores às precipitáveis em solução contendo 90% de etanol.

Todas as frações foram transferidas para frascos adequados com o auxílio de Pipetas Pasteur e volumes mínimos de água, suficientes apenas para solubilizar e transferir toda a fração. Posteriormente, foram liofilizadas em liofilizador Klosevac® Chriss.

4.6.2. Testes de purificação de FOS e de levana utilizando um sistema de partição em três fases

Foram testados, nesta etapa, dois dos parâmetros que poderiam influenciar na eficiência de separação dos FOS ou da levana por este método de partição: temperatura e tamanho molecular do carboidrato. Para todos os parâmetros foi preparado um padrão negativo, sem o açúcar testado.

Para testar o parâmetro temperatura, foi preparada a solução aquosa com o sulfato de amônio a 45% (m/V) e levana total a 1,5% (m/V). Transferiu-se 0,5mL desta solução para cada um de dois tubos de Eppendorf de 1mL, previamente identificados, e a ela adicionado 0,5mL de t-butanol (Merck). Os tubos de Eppendorf foram agitados por inversão cem vezes e, em seguida, submetidos à temperatura do teste (30, 35, 40 ou 45°C) por uma hora.

Para avaliar a influência do peso molecular da levana na eficiência do método, foram preparadas soluções aquosas com o sulfato de amônio a 45% (m/V)

e diferentes frações da levana, bem como de a Raftilose Orafti® a 3% (m/V). Foi transferido 0,5mL de cada solução para dois tubos de Eppendorf de 1mL previamente identificados, e a esse volume adicionado 0,5mL de t-butanol (Merck®). Os tubos de Eppendorf foram agitados em vórtex, por um curto período de tempo, suficiente apenas para se obter uma emulsão homogênea, e, em seguida, submetidos à temperatura do teste (30, 40 ou 45°C) em banhos-maria Cientec® e Ética®, por uma hora.

As fases foram coletadas usando-se uma pipeta Pasteur, inicialmente colhendo-se a fase orgânica (do topo), em seguida a fase aquosa (da base) e, por último, a lâmina interfacial, conforme indicado por Dennison & Louvrien (1997). À medida que eram coletadas, as fases eram imediatamente transferidas para balões volumétricos de 1 ou 2mL, os quais eram completados com água destilada.

O conteúdo de carboidratos na fase aquosa e na lâmina foi dosado pelo método de Dubois *et al* (1956).

4.6.3. Construção das curvas de solubilidade das frações de levana hidrolisada

Pesou-se diretamente em um frasco de Erlenmeyer de 250mL ou de 125mL, a fração liofilizada para a qual se desejava construir a curva de solubilidade em balança semi-analítica Marte®. O frasco de Erlenmeyer deveria estar bastante limpo e peso foi anotado para que pudesse ser utilizado posteriormente no cálculo da composição da mistura no primeiro ponto. A massa da fração utilizada dependia da disponibilidade de material. Mas, tinha que ser suficiente para permitir a obtenção de um volume mínimo de uma solução concentrada (acima de 70%), necessário a uma visualização segura da turvação pela adição de etanol. As massas variavam em torno de 1 a 1,5g da fração e aproximadamente 0,4 a 0,5g de água. Isso para que a turvação pela adição de EtOH fosse visualizada com segurança.

Após a adição de água, pesou-se o frasco de Erlenmeyer. Titulou-se a solução até que fosse possível visualizar a sua turvação pela insolubilização da levana presente contra um fundo escuro. Pesava-se o frasco de Erlenmeyer, adicionava-se o menor volume de água destilada suficiente para solubilizar a levana precipitada e pesava-se novamente. Então se procedia a uma nova titulação até

nova turvação e assim por diante até que não fosse mais possível visualizar a precipitação/solubilização da levana na mistura. Todo o procedimento foi realizado a 25°C e com o auxílio de uma balança semi-analítica Marte®, suporte com garras, bureta e etanol absoluto da marca Cinética®.

Terminados os experimentos, calculou-se quanto em massa de cada componente estava presente no frasco de Erlenmeyer no momento de virada da mistura (cada ponto), calculava-se quanto em percentual cada componente representava na massa total da mistura e plotavam-se os gráficos com o auxílio do programa Excel.

4.7. Tratamento e análise das amostras

As amostras submetidas à análise por CLAE, foram previamente filtradas com o auxílio de um sistema de filtração e membrana com poros de 0,2µm.

4.7.1. Determinação de glicose, frutose e sacarose

Estes açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo HP série 1100, Fase móvel: água Milli-Q, coluna: CARBOHYDRATE (10µm, 6,5mm x 300mm), temperatura do forno: 80°C e fluxo: 0,5 mL/min, detector: índice de refração.

4.7.2. Dosagem de FOS

Os FOS foram dosados indiretamente, após sua hidrólise ácida, na forma de glicose e frutose na solução resultante. A quantidade de FOS total presente foi obtida pela diferença entre o somatório das concentrações dos açúcares dosados no hidrolisado e o somatório das concentrações de glicose, frutose e sacarose dosadas nas amostras antes da hidrólise (Bekers *et al*, 2001; Oseguera *et al.*, 1996; Hatakeyama *et al*, 1996; Bekers *et al*, 2002; Sangiliyandi *et al*, 1999; Sangiliyandi & Gunasekaran, 2001; Jang *et al*, 2001; Sunitha *et al*, 2000):

$$\text{FOS} = (\text{Fr}_2 + \text{Gl}_2) - (\text{Fr}_1 + \text{Gl}_1 + \text{Sac}_1), \text{ sendo}$$

(Fr₁ + Gl₁ + Sac₁) a soma de frutose, glicose e sacarose antes da hidrólise e

(Fr₂ + Gl₂) a soma de frutose e glicose após a hidrólise.

4.7.3. Determinação da biomassa

Volumes de 5 mL das amostras coletadas da fermentação, foram centrifugados para a retirada das células, a 4.500 rpm por 20 min. O mosto sem células foi reservado para as demais análises e a massa celular lavada, ressuspensando-se a mesma em água destilada e transferindo-a para um balão volumétrico. A concentração de células foi dada pela absorbância lida em espectrofotômetro a 660nm após a construção de uma curva de calibração associando a absorbância da suspensão de células ao peso-seco a 110°C por 24h (Reiss & Hartmeier, 1990).

4.7.4. Dosagem da levana por peso-seco

A levana proveniente de 5 mL de caldo, precipitada pela adição de três partes de etanol absoluto quase congelado a uma do fermentado e posteriormente centrifugada a 10.000rpm por 25 min, foi ressolubilizada em, no máximo, 4mL de água destilada e transferida para pesa-filtros previamente secos e tarados. Estes pesa-filtros, contendo a solução concentrada de levana, foram levados à estufa Fanem®, onde permaneceram a 110°C por 24h, quando foram pesados (Reiss & Hartmeier, 1990).

4.7.5. Dosagem de carboidratos totais

A dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método de Dubois *et al* (1956). Este método foi utilizado para a dosagem de carboidratos nas fases dos experimentos de partição em três fases (TPP).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fermentações a 30, 35 e 40°C

A primeira parte deste trabalho envolveu a realização de fermentações em diferentes temperaturas, para o estudo da produção de FOS por via fermentativa.

Na Fig. 14, são apresentadas as variações nas concentrações de FOS, levana, sacarose e biomassa durante as 72h dos experimentos realizados a 30, 35 e 40°C. Os dados obtidos foram plotados por partes de forma a facilitar a compreensão e os comentários. Em cada gráfico pertencente à Figura 14, está representada a variação da concentração de FOS versus um dos três parâmetros medidos. A primeira coluna de gráficos corresponde aos dados do experimento realizado a 30°C; a segunda, aos dados do experimento realizado a 35°C; e a terceira, aos do realizado a 40°C. O primeiro gráfico de cada coluna tem a concentração de FOS versus a de biomassa; o segundo representa a concentração de FOS versus a de sacarose; e o terceiro, a concentração de FOS versus a de levana. Baseando-se nos dados representados nos gráficos da Fig. 14, puderam ser feitos os comentários abaixo.

A produção de FOS a 30°C teve início antes das 12h de processo e cessou às 24h, quando sua concentração no meio foi reduzida significativamente até as 48h, e mais sutilmente das 48 às 72h, ao final do experimento. O aumento da concentração de FOS no meio coincidiu com o crescimento da biomassa. A queda na sua concentração, por sua vez, a partir das 24h, coincidiu com a desaceleração do crescimento microbiano e do consumo de sacarose (Fig. 14).

A levana, por outro lado, só teve sua concentração no meio incrementada quando uma quantidade significativa de FOS já estava presente, o que pode sugerir o uso dos FOS produzidos na síntese desta. Quando a concentração de FOS no meio caiu, das 24 às 48h, a levana continuou a ser produzida. Talvez a produção de moléculas menores tenha dado lugar à simples elongação das cadeias dos FOS já presentes (a levansacarase talvez tenha passado a usar FOS ou moléculas maiores como aceptor no lugar da sacarose). Outra possibilidade é a de que o direcionamento de FOS para a síntese da levana tenha sido intenso ao ponto de superar a velocidade de produção destes últimos, de forma que a concentração

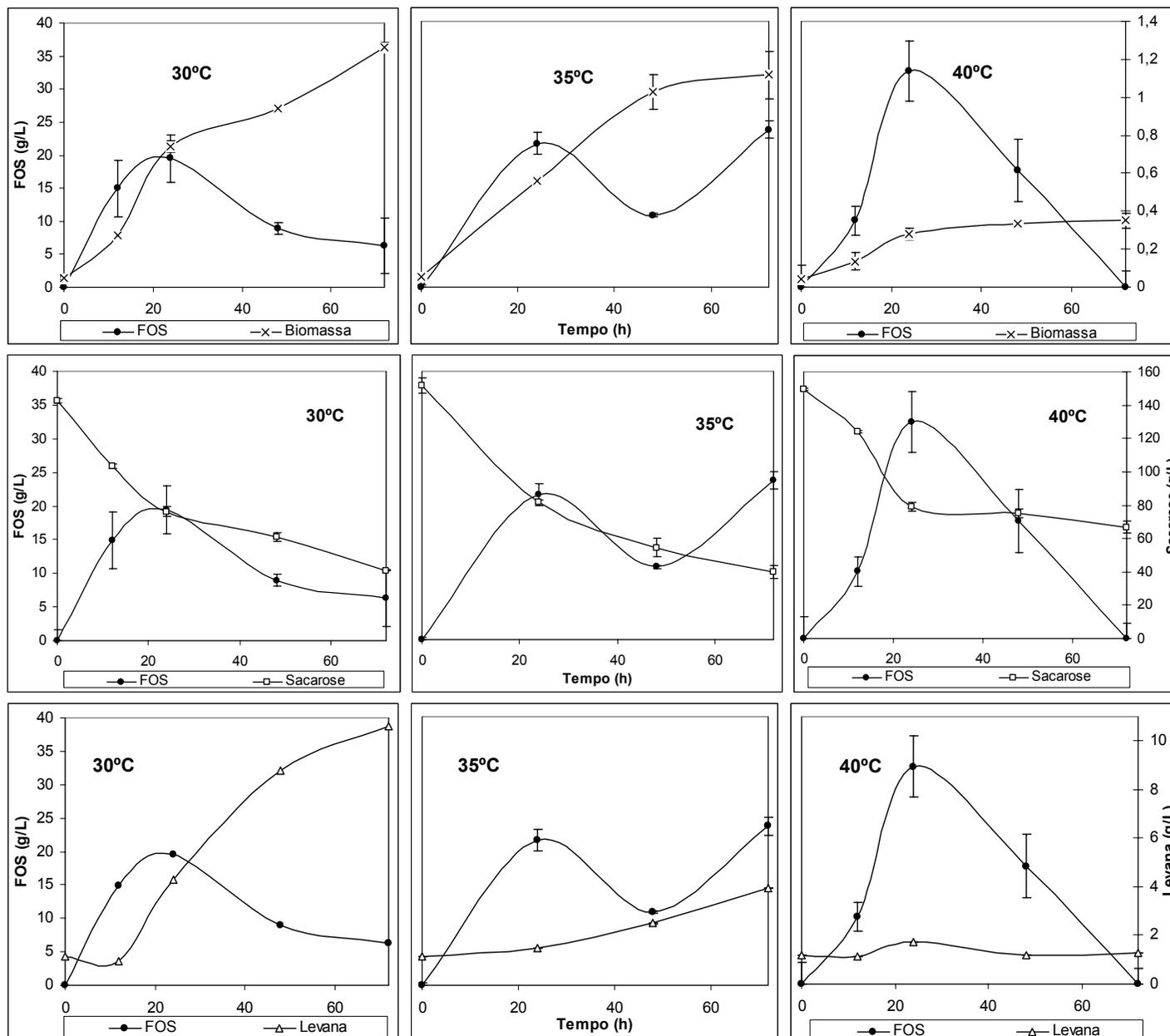


Fig 14- Variações nas concentrações de FOS em relação às de Biomassa, Sacarose e Levana em fermentações realizadas a 30, 35 e 40°C. A primeira coluna de gráficos corresponde aos dados do experimento realizado a 30°C; a segunda, aos dados do experimento realizado a 35°C; e a terceira, aos do realizado a 40°C. O primeiro gráfico de cada coluna tem a concentração de FOS versus a de biomassa; o segundo representa a concentração de FOS versus a de sacarose; e o terceiro, a concentração de FOS versus a de levana.

deles no meio não só não aumentou mais, apesar de estarem sendo produzidos, como foi reduzida significativamente (Fig. 14).

O aumento da temperatura favoreceu a produção de pequenas moléculas como os FOS (Fig. 14), assim como favorece a atividade de hidrólise da sacarose, mas desfavoreceu a produção de levana (Fig. 14). Esta observação confirma e é suportada por outros trabalhos da literatura, como o de Crittenden & Doelle (1994) ao registrar que a formação de levana foi a principal reação catalisada pela enzima a baixas temperaturas, mas que esta atividade era termolábil, sendo praticamente anulada a 35°C e que a temperatura ótima tanto para a hidrólise da sacarose quanto para a formação de FOS foi de 45°C. Calazans (1997), e Jang *et al.* (2001), que afirmaram que o peso molecular médio das levanas formadas é menor a altas temperaturas quando a levanassacarase é usada na sua forma livre como nos meios fermentados.

Sabe-se que a levanassacarase gera produtos provenientes de duas atividades, hidrólise e transfrutossilacção, mas é possível que os produtos da atividade de transfrutossilacção sejam gerados de forma diferente, em sítios distintos (Hijum, 2003; Ozimek *et al.*, 2004), uma vez que fatores como temperatura e concentração de sacarose influenciam de forma diferente a formação destes produtos (levana e FOS). Também é possível que o sítio ativo seja o mesmo, mas que o produto a ser formado seja resultante apenas do tempo que a enzima permanece ligada à cadeia nas condições impostas. Outra possibilidade é a de que, no mesmo sítio ativo, a enzima catalise a união de sacarídeos por mais de um tipo de ligação β . Das três possibilidades, a segunda parece ser a menos provável, podendo ocorrer apenas como complemento de uma das outras duas, pois não possibilita a explicação da síntese de moléculas como 1-kestose, nistose, frutofuranosilnistose (Figs. 1 a 3), que possuem ligações diferentes de β -(2 \rightarrow 6) e são produtos da levanassacarase de *Z. mobilis* e de outros microrganismos. Se a formação de um ou outro produto fosse apenas uma questão de cinética enzimática, ambos teriam, obrigatoriamente, que apresentar apenas ligações do tipo β -(2 \rightarrow 6). Poder-se-ia pensar na existência de outra enzima com atividade de transfrutossilacção, mas não há relatos de que haja outra β -frutofuranosidase sendo produzida pela *Z. mobilis*.

Está provado que a hidrólise da sacarose ocorre em um sítio ativo separado do de transferência de grupos frutossil a aceptores (Bekers *et al*, 2002; Euzenat *et al*, 1997, Hijum, 2003; Ozimek *et al*, 2004; Park *et al*, 2003). O que não se tem certeza, ainda, é do exato mecanismo de formação de FOS e de levana. Kobayashi & Matsuda, em 1978, afirmaram que o mecanismo de alongação das cadeias de levana e de dextrana de *Bacillus subtilis* é do tipo ping-pong, mas esta afirmação parece não corresponder ou não ter sido investigada nas frutotransferases de outros microrganismos como *Z. mobilis*, além de se referir apenas à alongação da cadeia e não ao início de sua formação, que se confunde (ou tem o mesmo significado) com a produção de FOS.

Sempre que a concentração de FOS diminuiu, a sacarose teve sua velocidade de consumo reduzida, ou mesmo cessada, tornando-se constante (Fig. 14). Talvez porque, nestes períodos, principalmente em temperaturas maiores, a levansacarase estivesse utilizando a sacarose para produzir oligossacarídeos em maior proporção do que levana. A produção desta última, por sua vez, pode ter ocorrido a partir dos FOS presentes no meio, os quais estariam atuando como doadores e como aceptores na reação de transfrutosilação. Pode-se sugerir portanto, considerando-se FOS um produto distinto de levana, que esta última não é produzida diretamente a partir da sacarose mas sim, indiretamente, a partir dos FOS.

O comportamento da curva de FOS das 48 às 72h foi diferente em cada temperatura testada (Fig. 14). Enquanto a 30°C a velocidade de desaparecimento destes no meio apenas reduziu, tornando-se próximo da constância, a 40°C a velocidade de desaparecimento permaneceu em $-0,62$ a $-0,73\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ até o fim, mas a 35°C, a concentração de FOS no meio surpreendentemente aumentou depois de ter caído das 24 às 48h (Fig. 14 e Tabela 2).

É notável a influência prejudicial de altas temperaturas no crescimento de *Z. mobilis*. Mas, apesar do prejuízo na produção de biomassa, esta bactéria cresce mesmo a 40°C. Portanto, baseando-se nas afirmações de Swings & De Ley (1977), a *Z. mobilis* ZAG 12 está incluída no pequeno grupo de cepas capazes de crescer acima de 30°C, e é uma das raras que crescem a 40°C (Fig. 14).

A maior produção de FOS foi obtida às 24h do processo conduzido a 40°C (Fig. 14), atingindo cerca de 32,5g/L no meio, enquanto que a 30°C, a maior concentração de FOS dosada foi de aproximadamente 19,5g/L no mesmo tempo de processo. Ao contrário da concentração de levana, cuja produção foi favorecida a 30°C dentre as temperaturas testadas, atingindo a concentração de 10,6g/L, mas sem passar de 1,7g/L a 40°C.

As diferenças na produção de FOS pela *Z. mobilis* a diferentes temperaturas podem acontecer também se a expressão da levansacarase tiver sido aumentada com a temperatura. De acordo com Schwab & Gänzle (2006), altas temperaturas de cultivo aumentaram a fluidez da membrana celular de *L. reuteri* e, conseqüentemente, a expressão das glicotransferases produzidas por ele. Estes autores testaram inibidores de crescimento com diferentes mecanismos de ação e apenas os que afetam a pressão lateral da membrana influenciaram a expressão da glicosiltransferases.

A pressão lateral de membrana pode ser entendida como uma pressão exercida pelas moléculas anfifílicas, umas sobre as outras, quando formam uma lâmina interfacial em presença de um líquido polar e um apolar. A teoria usada para explicar a formação de microemulsões facilita o entendimento. Em um sistema com dois líquidos imiscíveis e um tensoativo, a forma mais estável é quando se tem os dois líquidos separados em fases e o tensoativo formando uma lâmina monomolecular na interface, com o lado polar voltado para a fase aquosa e o apolar para o líquido orgânico. Aumentando-se a quantidade de tensoativo no meio as moléculas do tensoativo começam a se comprimir lateralmente desenvolvendo uma “pressão lateral bidimensional”. A tensão superficial diminui proporcionalmente ao aumento da pressão lateral até que essa última exceda aquela e a formação de micelas seja espontânea. Ou seja, a variação de energia torna viável a expansão espontânea da interface e a existência temporária de uma pressão lateral superior à tensão interfacial orienta a força que conduz a formação de micelas e reduz o tamanho das gotas até não haver mais necessidade de energia para aumentar a área interfacial (Oliveira *et al*, 2004).

Monolâminas fosfolipídicas, como moléculas anfifílicas que são, têm uma tendência intrínseca para a curvatura interfacial, mas, em bilâminas biológicas, as

monolâminas são superfícies planas apesar da tendência para a curvatura da monolamina. Por isso, os fosfolipídeos na membrana biológica exercem uma pressão lateral devido a esta frustração da curvatura (Schwab & Gänzle, 2006), dando a entender que quanto maior é a avidez das monolâminas pela curvatura e há frustração desta curvatura, maior é a pressão lateral. Enquanto no caso das microemulsões esta pressão lateral pode ser aliviada pela curvatura da lâmina com a formação das micelas, nas membranas biológicas a permanência da pressão lateral é imposta pela presença da outra monolamina. Uma alta temperatura aumenta a curvatura interfacial em monolâminas e, conseqüentemente, a pressão lateral na bilamina, e o aumento da pressão lateral favorece a expressão de glicosiltransferases como afirmado por Schwab & Gänzle (2006).

Schwab & Gänzle (2006), considerando que a expressão de frutossiltransferases em *L. reuteri* pode ser mediada por alterações da membrana, afirmaram que a pressão lateral é um provável candidato a mediador do efeito de estressores ambientais na expressão de glicosiltransferases em *L. reuteri*.

O que foi verificado para o *L. reuteri* pode ter se passado também com *Z. mobilis* nestes experimentos em que o maior rendimento de FOS ocorreu à temperatura mais alta testada. A alta temperatura do processo, por aumentar a fluidez da membrana e influenciar a pressão lateral desta última pode ter favorecido a excreção da levansacarase que, estando em uma concentração maior no meio, rapidamente gerou uma quantidade de FOS, mais alta que para as outras temperaturas testadas.

Na fermentação a 35°C, as maiores concentrações de levana e oligossacarídeos atingidas são intermediárias às obtidas nas outras duas temperaturas investigadas. Porém, o comportamento da curva de FOS, quando o processo foi conduzido a esta temperatura, merece especial atenção (Fig. 14).

A velocidade de produção de FOS a 30°C foi superior àquela observada a 40°C e depois reduziu, o contrário do que ocorreu a esta última temperatura, quando a velocidade de produção foi maior das 12 às 24 do que nas primeiras 12h (Tabela 2).

A velocidade de produção de levana a 30°C foi muito maior que a produção nas demais temperaturas testadas, sendo de 12-48h o período em que se obteve a maior velocidade de produção a 30°C, mais de 5 vezes superior à produção a 40°C.

E, quando calculada no intervalo de 0-24h, a velocidade de produção de levana a 30°C foi quase dez vezes superior à sua produção a 35°C (Tabela 3).

Tabela 2. Velocidades médias de produção ou consumo de FOS a 30, 35 e 40°C em g.L⁻¹.h⁻¹

PERÍODO	30°C	35°C	40°C
0-12h	1,246	Não registrado	0,838
12-24h	0,378	Não registrado	1,873
0-24h	0,812	0,900	1,355
24-48h	-0,44	-0,897	-0,622
48-72h	- 0,111	0,536	-0,733

Tabela 3. Velocidades médias de produção ou consumo de Levana a 30, 35 e 40°C em g. L⁻¹.h⁻¹

PERÍODO	30°C	35°C	40°C
0-12h	-0,018	Não registrado	0,007
12-24h	0,279	Não registrado	0,050
0-24h	0,130	0,014	0,022
24-48h	0,188	0,041	-0,022
48-72h	0,074	0,061	0,003

Tabela 4. Velocidades médias de consumo de Sacarose a 30, 35 e 40°C em g. L⁻¹.h⁻¹

PERÍODO	30°C	35°C	40°C
0-12h	-3,256	Não registrado	-2,109
12-24h	-2,233	Não registrado	-3,788
0-24h	-2,745	-2,922	-2,948
24-48h	-0,633	-1,117	-0,159
48-72h	-0,824	-0,607	-0,341

A velocidade de produção de levana nas primeiras 24h a 35°C foi inferior à verificada a 40°C neste mesmo intervalo (Tabela 3). Esta observação difere do esperado, pois sabe-se que o incremento na produção de levana é inversamente proporcional ao aumento da temperatura do processo. Mas isto pode ser explicado pela possibilidade de estar ocorrendo uma maior expressão da levansacarase a 40°C do que a 35°C, talvez suficiente para compensar os efeitos inibitórios do aumento da temperatura sobre a síntese do polissacarídeo.

Na fermentação conduzida a 40°C, o consumo de sacarose mais intenso entre 12 e 24h (3,788g.L⁻¹.h⁻¹) coincidiu com a produção mais acentuada de FOS (1,873 g.L⁻¹.h⁻¹). Às 24h, praticamente cesou o consumo de sacarose e também a produção de levana. Houve também uma queda brusca na concentração de oligossacarídeos, como se eles estivessem sendo consumidos no lugar da sacarose, o que pode

indicar tanto a utilização destes pelo microrganismo quanto sua hidrólise (Fig. 14 e Tabelas 2 e 4).

A biomassa entrou em fase estacionária em, aproximadamente, 24h de processo. A influência da temperatura no crescimento da *Z. mobilis* pode ser visualizada mais claramente pela sua velocidade crescimento (μ) nas primeiras 24h de processo, que foram:

$$\mu 30^{\circ}\text{C} = 0,03\text{h}^{-1}$$

$$\mu 35^{\circ}\text{C} = 0,02\text{h}^{-1}$$

$$\mu 40^{\circ}\text{C} = 0,01\text{h}^{-1}$$

O consumo de sacarose teve perfis parecidos nos processos realizados a 30 e a 35°C e a sacarose residual foi praticamente a mesma nos processos realizados a essas duas temperaturas, mas a 40°C a sacarose residual foi 25g/L maior, e seu consumo praticamente cessou às 24h de processo enquanto a 30 e 35°C o consumo apenas foi reduzido. Praticamente não houve produção de levana e a biomassa cresceu muito menos que nos processos realizados a 30 e 35°C. Apesar de tudo isso, a melhor produção de FOS foi a essa temperatura, tendo a concentração destes no meio atingido valores mais de 10g/L acima dos alcançados nas demais temperaturas. Assim sendo, e tendo a biomassa crescido muito pouco, pode-se imaginar três possibilidades:

(1) a concentração de levanassacarase no meio não foi alta, mas a maior concentração do substrato no meio a estimulou a funcionar mais rapidamente;

(2) ocorreu o que foi verificado por Schwab & Gänzle (2006) para o *L. reuteri*, com *Z. mobilis* e, apesar da menor quantidade de células no meio, a excreção da enzima a esta temperatura foi mais alta que nas outras testadas, compensando ou superando a atividade total nas outras condições; ou

(3) pelo mesmo motivo da hipótese 2, a excreção da levanassacarase pela *Z. mobilis* foi superior à ocorrida nas outras temperaturas atingindo concentrações equivalentes da enzima no meio, mas pela elevada concentração de sacarose que ainda estava presente, superior à encontrada nas outras condições, a enzima foi estimulada a trabalhar mais rapidamente.

Além disso, por causa da temperatura e, conseqüentemente da maior energia do sistema, a enzima provavelmente permanece menos tempo ligada a uma mesma

molécula e, por isso, não é possível gerar cadeias com extensão de um polissacarídeo. A elevada energia do sistema também favorece a cinética enzimática e as reações ocorrem em menos tempo, uma vez que a energia de ativação é atingida mais facilmente.

Quanto à queda brusca da concentração de FOS no meio após as 24h do processo realizado a 40°C, eles certamente não estavam sendo utilizados na síntese de levana, pois praticamente não houve produção desta. A biomassa, por sua vez, entrou em fase estacionária, além de haver ainda uma grande quantidade de sacarose disponível no meio, a qual certamente teria prioridade no consumo pelas células em relação aos FOS. Então, provavelmente, eles também não estavam sendo consumidos pelas células. Uma possível explicação para este consumo de FOS pode ser encontrada então observando-se as variações das concentrações dos outros açúcares dosados.

Se a variação na concentração de ART no período de 24-72h da fermentação realizada a 40°C for observada (Fig 15), pode-se imaginar que os FOS que estão desaparecendo do meio estariam sendo hidrolisados a frutose, uma vez que esta é um açúcar redutor e o aumento de ART corresponde à queda na concentração de FOS (pouco mais de 30g/L).

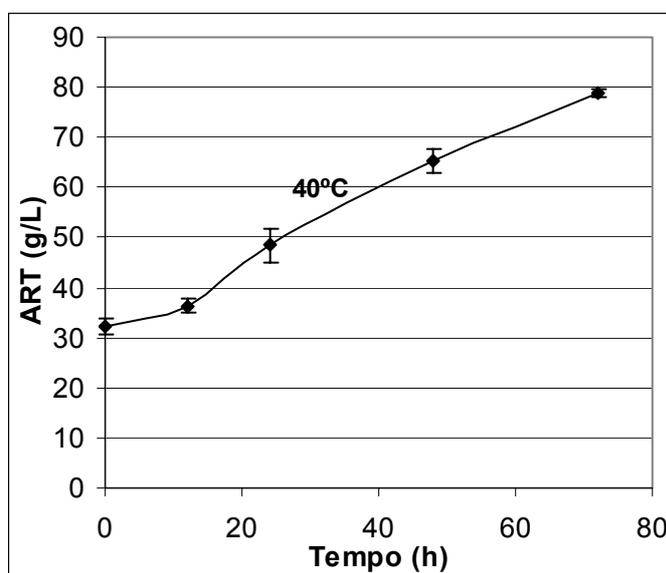


Fig. 15- Soma das concentrações de glicose e frutose, representando ART na fermentação realizada a 40°C.

Como nas dosagens foram diferenciados glicose e frutose (Fig. 16), pode-se considerar que o aumento de ART estaria sendo causado apenas pela hidrólise dos FOS: (1) se estes fossem constituídos de iguais quantidades de glicose e frutose já que as concentrações dos dois açúcares estão aumentando igualmente a partir das 24h de processo, ou (2) se, além dos FOS a sacarose estivesse sendo degradada e gerando iguais quantidades dos dois açúcares. Ainda assim a quantidade de frutose gerada seria superior. Mas, se ao mesmo tempo a frutose estivesse sendo convertida a outras substâncias não analisadas com a mesma velocidade que estaria sendo gerada pela hidrólise dos FOS, este crescimento das concentrações de glicose e frutose igual e linear sem o aparecimento do excesso de frutose poderia ser justificado (Fig. 16). Como, dentre os produtos de transfrutoseilação, nenhum tem igual quantidade de glicose e frutose em sua cadeia, é possível que neste período de 24 a 72h do processo realizado a 40°C, estivesse havendo hidrólise da sacarose e a frutose liberada pela degradação de FOS estivesse sendo completa e rapidamente convertida a sorbitol.

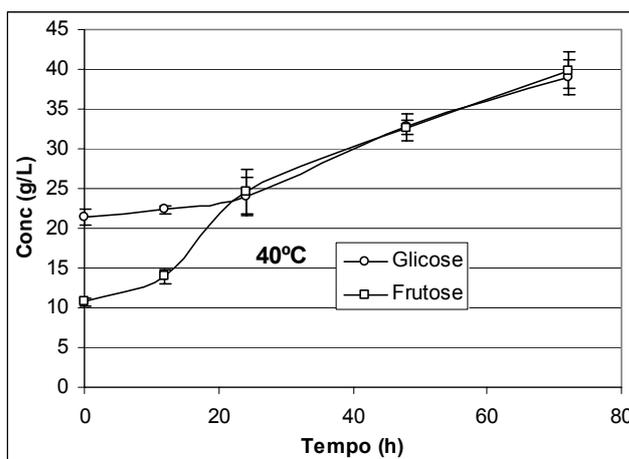


Fig. 16- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 40°C.

Nas primeiras 24h, o aumento da concentração de frutose retrata hidrólise de sacarose sem ou em velocidade superior à de polimerização (Fig. 16). A concentração de glicose não aumenta proporcionalmente à de frutose, provavelmente por estar sendo consumida pela *Z. mobilis*, que mantendo-se praticamente constante. A velocidade de consumo de glicose pela *Z. mobilis* deve

corresponder à de liberação deste açúcar pela hidrólise da sacarose e pela polimerização.

A degradação dos FOS neste período de 24-72h do processo conduzido a 40°C, pode ter ocorrido enzimaticamente, como Hatakeyama *et al* (1996) verificaram para a β -frutofuranosidase de *Scopulariopsis brevicaulis*, por invertases ou mesmo pelos ácidos orgânicos que *Z. mobilis* produz (lático, acético e glucônico), como verificado por Bekers *et al* (2005).

Vina *et al* (1998) estabeleceu que a levana purificada produzida por *Z. mobilis* possui uma relativa estabilidade estrutural em solução aquosa a pH 5,0-4,0 e temperaturas de 25 a 70°C (Bekers *et al*, 2005). Extrapolando estes dados para FOS, pode-se imaginar que eles também poderiam ser estruturalmente estáveis nestas condições uma vez que são estruturalmente iguais à levana, com exceção do tamanho de suas cadeias. Os meios testados por Vina *et al* (1998) não são suficientemente ácidos quando comparados ao pH~3,5 atingidos nestas fermentações da *Z. mobilis*, o que justifica a não hidrólise deste polissacarídeo nos experimentos realizados por esses autores.

Apesar disso, não se pode explicar a queda na concentração de FOS neste período pela simples hidrólise dos FOS a frutose, pois se isto estivesse acontecendo a concentração de frutose aumentaria muito, distanciando-se da glicose, o que não ocorreu. Mas os FOS de fato desaparecem do meio a partir das 24h de fermentação e apesar de não terem sido analisados os demais metabólitos produzidos neste processo fermentativo, sabe-se que ao fermentar sacarose, bem como glicose e frutose livres, quando presentes em concentrações relativamente altas, *Z. mobilis* tem as vias de produção de etanol e sorbitol ativadas e é possível que isto esteja ocorrendo nesta situação.

De acordo com Doelle *et al* (1993), concentrações de glicose acima de 7g/L em presença de frutose já implicam na formação de sorbitol. Já Sprenger (1996) afirma que a formação de sorbitol ocorre quando *Z. mobilis* cresce em sacarose ou em meio de glicose e frutose quando estes últimos excedem a concentração de 5%, cada. As concentrações de glicose e frutose no meio neste período da fermentação, estiveram entre 25 e 40g/L (ou seja, 2,5%), mas estava bem acima da primeira (7g/L) e é possível o direcionamento da frutose liberada pela hidrólise dos FOS para

a formação de sorbitol. A sacarose também está presente no meio em concentração suficiente para estimular esta via metabólica da bactéria junto aos referidos monossacarídeos.

Uma crescente concentração de frutose no meio pode ser o sinal de um futuro estresse osmótico para *Z. mobilis*. Se a glicose-frutose óxidorredutase (GFOR) (EC 1.1.99.28) (Enzyme Commission, 2006) tem ambos os substratos presentes para formar sorbitol eficientemente, o polioliol pode ser acumulado nas células, via um sistema de transporte dependente de energia, para conter os efeitos da reduzida atividade de água sobre a célula (Sprenger, 1996). As altas temperaturas usadas neste experimento se aproximam das ideais para a produção de sorbitol (35-37°C) (Silveira *et al*, 1999).

O papel fisiológico da produção de sorbitol pela GFOR das células reside na proteção destas ao estresse osmótico. Quando as células estão estressadas com altas concentrações de açúcares (qualquer açúcar fisiológico ou maltose, apesar de não ser absorvida ou metabolizada), elas acumulam sorbitol intracelularmente até 1M para compensar a alta osmolaridade externa e conter os efeitos danosos de desidratação exercidos por ela (Sprenger, 1996). Apesar de protegê-la do estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcar, o sorbitol não protege a célula do estresse salino, e elas permanecem não hábeis a crescer em meios com mais de 2% de NaCl (Sprenger, 1996).

A velocidade de consumo de sacarose das 24 às 48h de fermentação a 35°C foi mais elevada que a 30°C (Tabela 4), justamente quando os FOS estavam sendo, provavelmente, degradados a $0,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, talvez por estarem sendo utilizados na produção de levana. Neste mesmo período, houve uma queda na concentração de glicose livre (consumo de glicose) de aproximadamente 10g/L (Fig. 17), enquanto a concentração de frutose praticamente não sofreu alterações apesar da quantidade de FOS que desapareceu do meio (Fig. 14) e certamente não foi para a produção de levana, muitas vezes inferior à quantidade de FOS degradada.

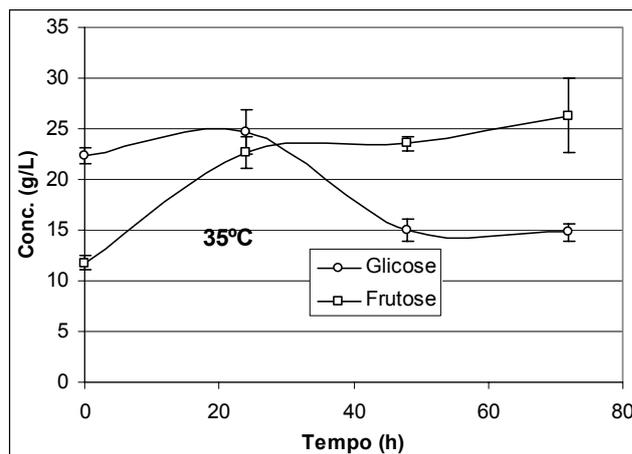


Fig. 17- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 35°C.

A 35°C, a queda da concentração de FOS entre 24-48h sem o aparecimento do excesso de frutose no meio pode ser explicada da mesma forma que a queda na concentração de FOS às 24h do processo realizado a 40°C: Ou seja, pelo direcionamento da frutose gerada para a produção de metabólitos não analisados, como por exemplo o sorbitol. Observando-se as concentrações de glicose e frutose às 24h do processo a 35°C (Fig. 17), quando se inicia a degradação de FOS (Fig. 14), estas se encontram a aproximadamente 25g/L. Aproximadamente as mesmas concentrações encontradas no mesmo período do processo realizado a 40°C, quando tem início o desaparecimento dos FOS. E as concentrações de sacarose neste momento também são, aproximadamente, as mesmas (pouco inferiores a 80g/L), o que permite considerar que talvez estas condições de elevadas temperaturas acompanhadas de concentrações limite de sacarose, glicose e frutose na presença de FOS em concentrações relativamente altas deflagrem eventos não conhecidos na fisiologia da *Z. mobilis* submetida previamente a um certo estresse osmótico.

A retomada da produção de FOS após as 24h do processo a 35°C (Fig. 14) pode ser explicada pelo fato de a levansacarase ser inibida por altas concentrações de glicose no meio. A β -frutofuranosidase de *Scopulariopsis brevicaulis* sofre inibição competitiva de glicose quando em concentrações de 0,1 e 0,05M (Hatakeyama *et al*, 1996), e também Crittenden & Doelle (1994) verificaram que a levansacarase de *Z. mobilis* também é inibida por glicose.

Observando-se o gráfico do processo a 35°C (Fig 17), pode-se notar que a concentração de glicose foi reduzida entre 24 e 48h, atingindo ao final deste intervalo de tempo, concentrações provavelmente baixas o suficiente para que a inibição prévia da levansacarase fosse revertida e esta enzima volta a produzir FOS. Já no processo realizado a 40°C, as concentrações não só de glicose mas também de frutose eram crescentes, não diminuíram como a no processo realizado a 35°C. Então, se a enzima já estava inibida com 25g/L de glicose livre, em concentrações superiores a inibição não seria revertida.

No processo realizado a 30°C (Fig. 18), a concentração de glicose só caiu a aproximadamente 13g/L às 72h de processo, quando o experimento foi encerrado. E, por isso, não foi possível visualizar a retomada da produção de FOS, que deve ter ocorrido a partir deste tempo de fermentação.

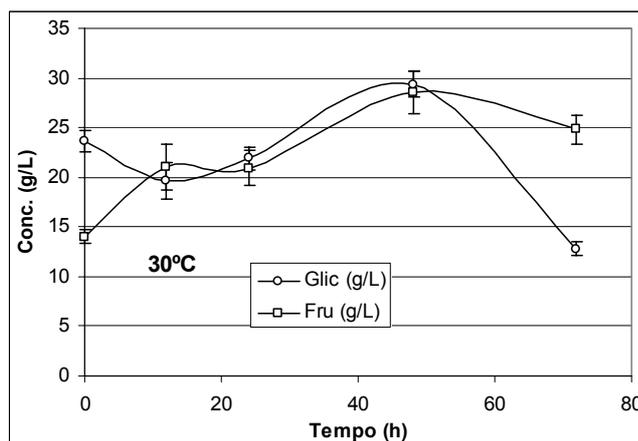


Fig 18- Variação das concentrações de glicose e frutose durante o processo fermentativo realizado a 30°C.

Bekers *et al* (2005) sugeriram que o meio de cultura age como fator de proteção prevenindo a degradação de levana. Os autores afirmam que em altas temperaturas e pH baixo, a levana pode ser utilizada como fonte de carbono. Certamente ele está sugerindo que *Z. mobilis* consome o polissacarídeo na forma de frutose, após a hidrólise ácida, que eles verificaram que ocorre nestas condições. Mas, certamente, isso só acontece quando tanto a sacarose quanto a glicose são esgotadas porque a afinidade dos sistemas de transporte transmembrana pela frutose é muito pequena e geralmente, ao final de uma fermentação para produção

de levana o açúcar residual é elevado. Ou seja, demora bastante para que toda a glicose e a sacarose se esgote e a bactéria passe a usar a frutose como fonte de carbono.

5.2. Distribuição dos FOS produzidos a 30, 35 e 40°C

A análise qualitativa dos FOS, nas amostras coletadas dos experimentos realizados a 30, 35 e 40°C permite observar a ausência do FOS com DP 3 em concentrações detectáveis. Este fato, já relatado por Coimbra (2003), reforça a possibilidade desta espécie molecular ser usada como o principal iniciador ou precursor das moléculas com mais elevados graus de polimerização. O FOS com DP 4 apenas foi detectado às 48h de fermentação realizada a 30°C e o FOS com DP 7, assim como o com DP 3 não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 5).

O processo em que foi registrada uma maior variedade de FOS com DP entre 3 e 13 foi o realizado a 30°C. Neste, apenas não foram detectados os FOS com DP 3 e 7, que também não estiveram presentes nas amostras de nenhum dos demais processos. A fermentação a 35°C foi a que apresentou menor variedade de FOS: além do 3 e do 7, não foram detectados os FOS com DP 4, 8 e 11. Já a 40°C, além dos FOS com DP 3 e 7, somente não foi encontrado o FOS com DP 4 (Tabela 5).

A Tabela 5 foi construída com base nas análises qualitativas dos FOS. Através dos dados nela representados, é possível também notar que os FOS com DP menores se apresentam em maior número a partir das 48h de processo, o que possivelmente ocorre pela desaceleração ou suspensão do aproveitamento destes como precursores de moléculas maiores.

Nas fermentações realizadas tanto a 30 como a 35°C, a maior variedade de FOS foi encontrada nos últimos tempos de fermentação (a partir das 48h), mas na realizada a 40°C, a maior variedade de FOS foi encontrada mais cedo, das 24 às 48h de processo (Tabela 5).

Através dos cromatogramas traçados por CLAE, através da técnica de exclusão de tamanho, pôde-se notar também que há alguns FOS que se acumulam com uma maior frequência. São eles:

- FOS com DP 5, a 35 e a 40°C.

- FOS com DP 6, que se acumulou no meio a 30 e 35°C, sempre nos últimos tempos de fermentação. Uma possibilidade é que este seja utilizado com maior velocidade nos tempos iniciais da fermentação, mas se acumula nos tempos finais quando não é mais requisitado com a mesma intensidade ou é produto da degradação de moléculas maiores.

- FOS com DP 9, encontrado mais vezes nos processos realizados a 30 e a 35°C, aparece e desaparece no tempo seguinte, não permanecendo em concentrações detectáveis no meio por um intervalo mais longo do processo fermentativo;

- FOS com DP 10, cuja frequência de aparições é reduzida com o aumento da temperatura de fermentação. Enquanto a 30°C este FOS aparece em mais amostras coletadas, a 35°C o número de vezes em que é detectado é menor além de serem alternadas e a 40°C aparece em apenas uma das amostras. Esse comportamento pode sugerir uma maior reatividade desta espécie molecular a temperaturas mais altas de processo.

- FOS com DP 12 - com este, acontece o inverso do que se passa com o FOS com DP 10. A frequência com que se encontra o FOS com DP 12 aumenta com o aumento da temperatura do processo, além de ser encontrado em amostras consecutivas. Ele parece ser bastante estável em relação aos FOS com os menores DPs por permanecer no meio por grandes intervalos de tempo. E a sua estabilidade parece aumentar com o aumento de temperatura.

A investigação da dinâmica de aparecimento/desaparecimento de cada FOS no meio pode contribuir para a elucidação dos mecanismos de síntese das cadeias de FOS e levana pela levanassacarase. A análise qualitativa ajuda mas, sob este aspecto, a análise quantitativa permitiria suposições mais bem fundamentadas, uma vez que seria possível acompanhar o desaparecimento de alguns tipos moleculares e o provável aparecimento simultâneo e proporcional de outros.

O conhecimento desta dinâmica de aparecimento/desaparecimento dos FOS no meio em determinadas condições de processo também é útil quando se deseja produzi-los. Conhecendo-se o tempo de processo em que o FOS ou o conjunto de FOS desejado está presente, pode-se planejar a duração do processo e o melhor

momento de iniciar a recuperação dos mesmos. Informações sobre como as condições influenciam esta dinâmica também são valiosas, uma vez que permitem a escolha da que fornece o (s) FOS desejado (s) em menos tempo.

Tabela 5- FOS detectados nos tempos de fermentações realizadas a 30, 35 e 40°C

Temp (°C)	Tempo (h)	DP											Total de FOS por amostra
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
30	0								*	*		*	3
	12							*	*				2
	24								*		*		2
	48		*		*			*			*	*	5
	72			*	*		*		*			*	5
35	0							*			*	*	3
	24			*					*		*		3
	48			*	*						*		3
	72			*	*			*	*				4
40	0										*		1
	12			*							*		2
	24			*					*	*	*		4
	48						*	*		*	*	*	5
	72			*	*								2
Total de aparecimento de cada FOS	-	0	1	7	5	0	2	5	7	3	9	5	-

A 30°C, e até 48h, observou-se a predominância dos FOS com maiores pesos moleculares e, após as 48h, pôde-se perceber uma melhor distribuição dos pesos moleculares presentes no meio.

A 35°C predominam os FOS com maiores pesos moleculares. Após as 48h, houve um espalhamento da distribuição dos pesos moleculares destes FOS e, após as 72h passaram a predominar os FOS com menores pesos moleculares.

A 40°C percebe-se uma ampliação da distribuição dos pesos moleculares dos FOS presentes no meio até às 48h. Mas, às 72h verifica-se apenas a presença dos FOS com os menores pesos moleculares.

O somatório dos FOS presentes em cada amostra permite a observação de que uma maior variedade de foi encontrada nos últimos tempos de amostragem em todos os processos realizados neste experimento. Neste período, os FOS com menores Pesos moleculares estiveram presentes em maior quantidade.

O somatório do número de amostras em que cada FOS foi detectado retrata a estabilidade dos mesmos. Os que aparecem em mais amostras são mais estáveis do que os demais. Assim sendo, pode-se estabelecer uma ordem crescente de estabilidade baseando-se nos dados da Tabela 5: 3 e 7 → 8 → 11 → 6, 9 e 13 → 5 e 10 → 12.

5.3. Produção de FOS por via enzimática no mosto fermentado submetido a diferentes condições de sacarose inicial, pH e temperatura.

Comparando-se as concentrações de glicose, frutose e sacarose no meio reacional nos tempos inicial e final da reação, pôde ser feita uma estimativa das atividades da levanassacarase durante as 24h de reação através do aparecimento dos produtos.

Observando-se a atividade total da levanassacarase (Fig. 19), estimada a partir da quantidade total de glicose liberada, pôde-se inferir que foi em meios reacionais com pH inicial de 5, o menor valor de pH testado, que a enzima apresentou suas melhores atividades. E dentre as temperaturas testadas, a de 40°C foi a mais favorável na maioria das condições de pH e concentração inicial de sacarose analisadas. Dentre as condições de produção enzimática de FOS e levana selecionadas para este experimento, aquela na qual a levanassacarase apresentou maior atividade total foi a de 250g/L de sacarose inicial, pH 5 e 40°C, liberando 192,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos referidos monossacarídeos a cada minuto.

No experimento realizado com 100g/L de sacarose inicial, pH 6 e 40°C (Fig. 19) não foi percebida alteração alguma no conteúdo de açúcares após as 24h de reação. Este resultado não parece ter sido causado pela influência desfavorável de um ou outro parâmetro isolado, mas que, possivelmente, a junção das condições impostas à enzima resultou nesta ausência de atividade.

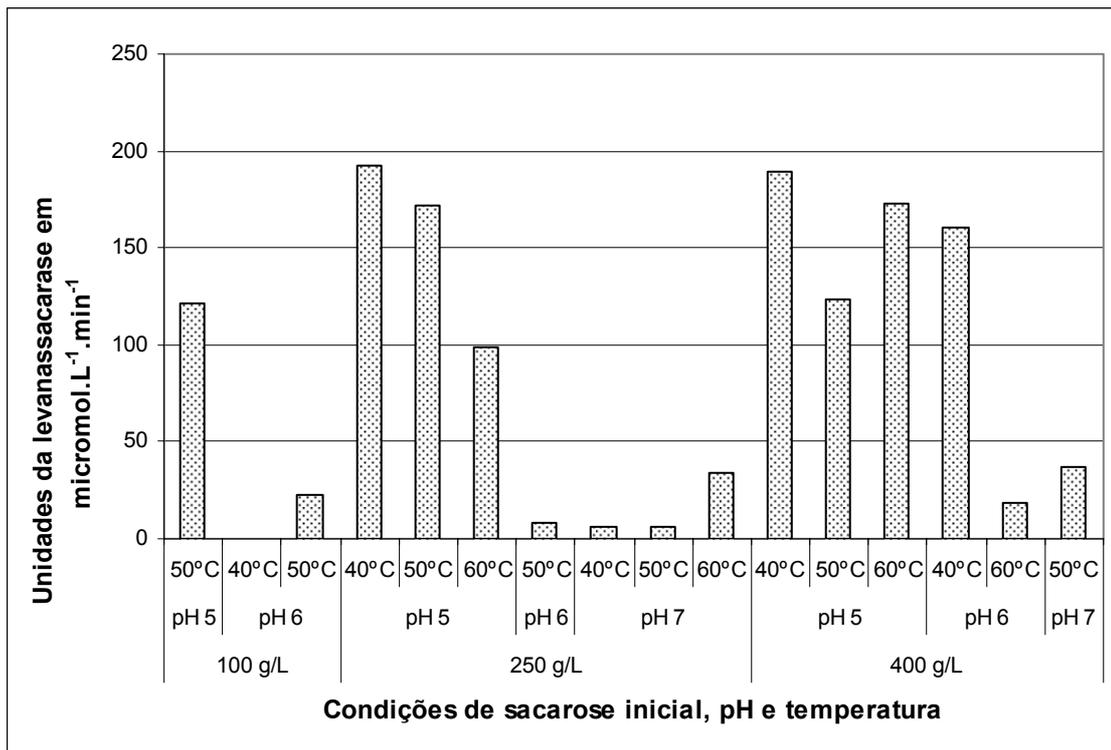


Fig. 19- Representação da atividade total da levanassacarase em meio fermentado sem células, submetido a diferentes condições de reação por 24h.

Ao diferenciar as atividades de transfrutossilação e hidrólise da levanassacarase estimadas (Fig. 20) nas mesmas condições de reação testadas, pode-se notar que a relação transfrutossilação/hidrólise não é a mesma em todas as situações e que as condições de temperatura, pH e concentração inicial de sacarose influenciam de forma diferente estas duas atividades da enzima. Observando-se os experimentos realizados a pH 5 e 50°C nas três concentrações iniciais de sacarose testadas, nota-se que a taxa hidrólise/polimerização diminui com o aumento da concentração, sendo a atividade de transfrutossilação, ou polimerização, favorecida com o aumento da concentração inicial de sacarose.

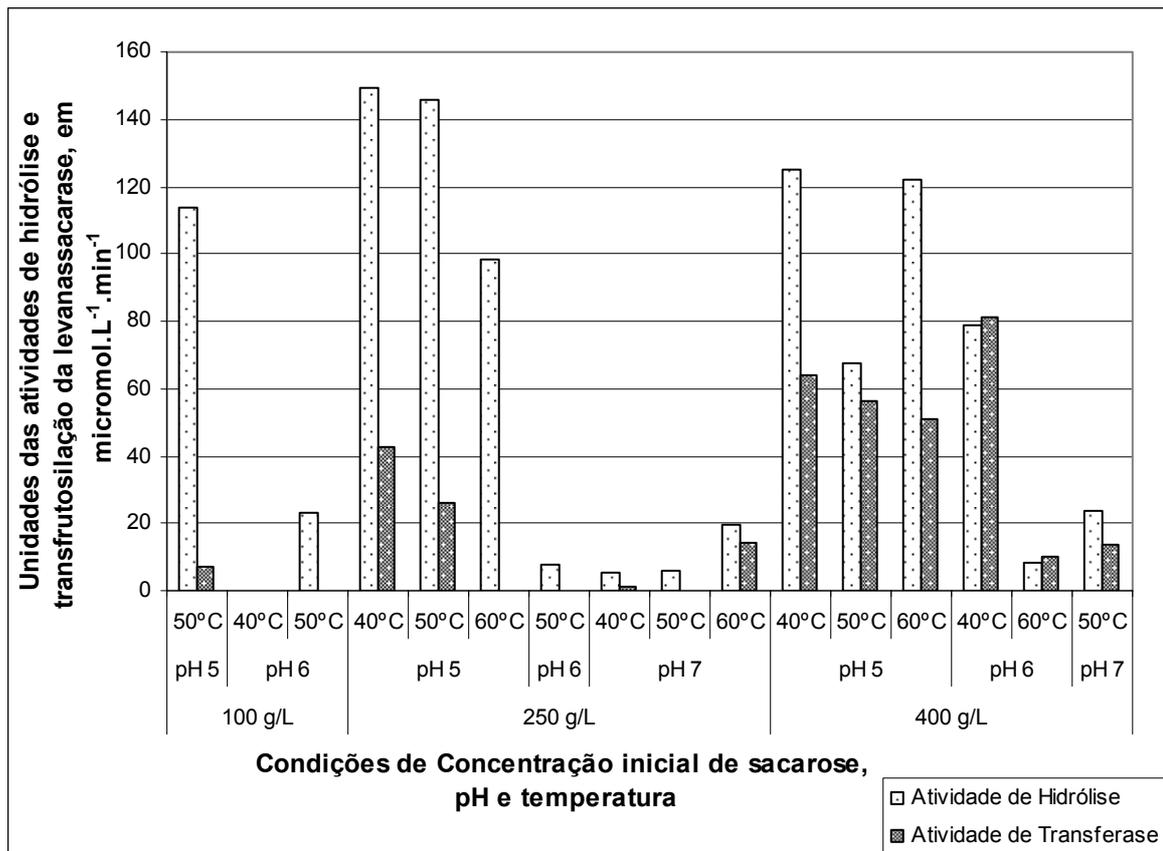


Fig. 20- Atividades de hidrólise e polimerização da levanassacarase em meio fermentado sem células, submetido a diferentes condições de reação por 24h.

Quanto à concentração inicial de sacarose, a 100g/L, a atividade de transfrutoseilação praticamente não foi detectada nos experimentos analisados. Ao se aumentar a concentração para 250g/L, esta atividade já pôde ser verificada quando o pH do meio reacional foi 5; e a 400g/L, foi ativada na levanassacarase em todos os experimentos analisados, enquanto a atividade de hidrólise parece ter sido favorecida pela concentração inicial de sacarose de 250g/L quando comparada com as outras concentrações estudadas.

O fato da concentração que mais favoreceu a atividade de transfrutoseilação ter sido a mais alta testada neste experimento, estimula a avaliação desta atividade em meios reacionais com concentrações mais elevadas de sacarose.

Na literatura, há relatos de que em concentrações menores de sacarose, a levanassacarase prioriza a hidrólise deste sacarídeo, com conseqüente prejuízo no rendimento de FOS (Támbara *et al.*, 1999). Neste trabalho, a concentração

selecionada como a mais favorável à atividade de hidrólise da sacarose foi a de 250g/L, intermediária dentre as testadas.

Quanto aos valores de pH testados, o pH 5 foi mais favorável à atividade de hidrólise do que à de transferência do frutossil. Neste valor de pH, apesar de haver polimerização, a quantidade de sacarose convertida em glicose e frutose livres foi, na maioria das condições analisadas, pelo menos o dobro da quantidade de sacarose cujo frutossil foi conduzido à polimerização.

O pH parece ter sido o parâmetro de maior influência sobre a atividade de hidrólise da sacarose, nas faixas dos parâmetros estudados. Mudanças nos valores de pH do meio reacional levaram a alterações bem mais intensas na atividade de hidrólise do que as modificações na concentração de sacarose ou da temperatura. Isso pode ser percebido ao se comparar condições de reação com diferentes valores de pH e mesma temperatura e concentração de sacarose, e repetindo-se este tipo de comparação para os outros parâmetros testados.

Já a concentração inicial de sacarose, seguida do pH, parece ter sido o parâmetro de maior influência na atividade de transfrutossilização da enzima, traduzida pelo aparecimento de frutose no meio. Isto porque a 400g/L a referida atividade foi superior às apresentadas nas mesmas condições de pH e temperatura nas outras duas concentrações testadas. Já a temperatura parece ter influenciado de forma parecida as duas atividades, pois nota-se que ambas são desfavorecidas com o aumento deste parâmetro na maioria das situações a partir de 40°C.

Crittenden & Doelle (1994), em seus experimentos com a levanassacarase de *Z. mobilis*, verificaram que a formação de levana foi a principal reação catalisada pela enzima a baixas temperaturas, mas que esta atividade era termolábil, sendo irreversivelmente inativada quando a levanassacarase era aquecida a 35°C. Também afirmaram que este comportamento em relação à produção de levana diferiu das atividades de hidrólise da sacarose e de formação de FOS, atividades cuja temperatura ótima foi de 45°C. A afirmação de que a produção de levana tenha sido "irreversivelmente" anulada pelo aumento da temperatura talvez tenha sido extremista. No experimento realizado a 35°C, neste trabalho de dissertação (Fermentações a 30, 35 e 40°C), a produção de levana não foi anulada apesar de ter reduzido bastante. Além disso, Crittenden & Doelle (1994) não relataram testes com

a levansacarase que trabalhara a 35°C, submetendo-a em seguida a condições de temperatura menores para verificar se a enzima realmente não voltaria a produzir este polissacarídeo.

Quanto à temperatura de produção de levana, outros autores que testaram temperaturas inferiores às testadas neste trabalho de dissertação confirmam a constatação de Crittenden & Doelle (1994). E quanto ao favorecimento das reações de hidrólise e síntese de FOS pela temperatura de 45°C, esta informação está de acordo com os resultados deste experimento de produção enzimática que, apesar de não ter avaliado a produção a 45°C, apontou uma temperatura próxima (40°C) como a ideal dentre as testadas. A afirmação de Crittenden & Doelle (1994) quanto à ativação e desativação das atividades de produção de FOS e de levana a diferentes temperaturas já indica a possibilidade da existência de sítios diferentes para a formação destes produtos.

Dentre as condições de reação analisadas, as que mais favoreceram a suposta atividade de transfrutossilacção da levansacarase foram 400g/L de sacarose inicial, pH 6 e 40°C estando, nestas condições, esta atividade representando mais de 50% da total. Ou seja, nestas condições de reação, mais da metade de toda a sacarose hidrolisada parece ter tido seu frutossil transferido para um acceptor. Támara *et al.* (1999) afirma ter obtido maiores concentrações de FOS à medida que a concentração de sacarose no meio era mais alta, sendo o máximo rendimento de 1-cestose (Fig. 1) e nistose (Fig. 2) atingido com concentrações iniciais de sacarose de 600g/L. Esta concentração, apesar de não ter sido testada neste experimento, confirma a tendência do resultado obtido (maior atividade de transfrutossilacção a 400g/L) e estimula a investigação da atividade da enzima em concentrações mais altas de sacarose.

Yun *et al* (1994) estudaram a produção de altos conteúdos de FOS através da acção da enzima pela associação de uma β -frutofuranosidase e uma glicose oxidase no mesmo sistema como uma forma de retirar a glicose do meio, anulando assim a inibição que ela exerce sobre a enzima. Eles determinaram que as condições ótimas para o referido sistema eram praticamente as mesmas usadas no experimento desta dissertação (item 5.4), com excessão do pH e da oxigenação, necessária para a manutenção da atividade da glicose oxidase. As condições seleccionadas por estes

autores foram: pH 5,5, 40°C, 400g/L de sacarose inicial, agitação de 550rpm e taxa de oxigenação de 0,7L/min em um tanque agitado contendo 0,7L da solução de sacarose com as enzimas. As enzimas foram misturadas numa proporção de 10 unidades de β -frutofuranosidase e 15 de glicose oxidase por grama de sacarose. Nestas condições, Yun *et al* (1994) obtiveram 98% de FOS, com o completo consumo de sacarose e glicose pelo sistema de enzimas associadas.

Ao comparar o conteúdo de FOS produzidos no sistema em que apenas β -frutofuranosidase estava presente com o que esta enzima se encontrava associada à glicose oxidase, os autores afirmaram que neste último sistema, um alto conteúdo de nistose foi acumulada e somente uma quantidade traço de frutofuranosil nistose foi detectada (Yun *et al*, 1994).

Este experimento significou apenas o primeiro passo do estudo de uma nova forma de produção de FOS pelo grupo de pesquisa de Processos Fermentativos (Departamento de Antibióticos-UFPE). É uma maneira mais rápida e prática. Se for aplicada com o complexo previamente extraído do meio pela adição de não-solventes, será mais limpa e, conseqüentemente, menos onerosa no sentido de reduzir os gastos com a purificação do produto.

A melhor atividade de transfrutossilacção da levanassacarase obtida dentre as estudadas foi de aproximadamente 80 μ mol/L/min. Ou seja, se toda esta atividade tiver resultado em FOS, no período de 24h foram produzidos aproximadamente, 20,7g/L. Por outro lado, a fermentação de sacarose pela *Z. mobilis* a 40°C resultou em 32,5g/L no mesmo intervalo de tempo. Calculando-se o rendimento de ambas as formas de produção de FOS testadas, a via fermentativa rendeu 21,6g de FOS por cada 100 gramas de sacarose adicionada ao meio, enquanto o rendimento da levanassacarase em meio com 400g/L de sacarose e pH 6,0 foi de 5,2g de FOS por grama de sacarose adicionada. Desta maneira, fica claro que a produção de FOS por fermentação, nas condições selecionadas, ainda é mais vantajosa do que se usando apenas a enzima.

Por outro lado, é possível que estudos adicionais sobre a produção usando-se a enzima em solução de sacarose melhorem muito estes rendimentos. A possibilidade de reutilização da levanassacarase em vários ciclos de síntese evita gastos com extrato de levedura, sais e manutenção de condições de esterilidade

para cada batelada de produção. Além disso, provavelmente o uso de uma enzima mais “jovem” poderá elevar consideravelmente o rendimento da produção. Este último experimento foi realizado com a levanassacarase produzida em pouco mais de 48h de fermentação, além do tempo adicional gasto para a preparação e início do novo processo usando apenas a conversão enzimática. Enquanto que no processo fermentativo a alta concentração de FOS se deu com 24h.

5.4. Teste de inativação da levanassacarase pelos reagentes dos métodos de Roe & Papadopoulos (1954) (ROE), para cetoses, e de Miller (1959), para açúcares redutores (DNSA)

Sabe-se que a levana bacteriana produzida é liberada para o meio na forma de um complexo levana-levanassacarase. Por comunicação verbal, feita por Jaqueline Maciel, mestranda no Departamento de Bioquímica-UFPE, tomou-se conhecimento de que a concentração de proteína na levana total liofilizada corresponde a 2,5mg/g de levana, podendo ser, portanto, considerada irrisória em relação à massa do complexo pesada no preparo das soluções para os experimentos.

Com o intuito de diferenciar as atividades hidrólise e de polimerização desta enzima pela comparação dos teores de glicose e frutose liberadas, de encurtar o tempo gasto e de verificar a possibilidade de redução da manipulação das amostras, realizou-se este teste. A partir dos resultados, esperava-se confirmar a possibilidade de realizar com segurança do procedimento adotado por Park *et al* (2003), para a levanassacarase de *Microbacterium laevaniformans*, e testar a inativação da enzima pelos reagentes do método de Roe & Papadopoulos (1954), bem como comparar as atividades da levanassacarase no complexo recém-produzido e no material liofilizado.

Se os reagentes classicamente utilizados para a dosagem de açúcares redutores e de aldoses no meio tinham características que desfavoreciam a atividade da enzima, como etanol em sua composição e valores extremos de pH, então a adição dos mesmos poderia resultar na inativação da mesma.

O experimento foi repetido três vezes devido às soluções resultantes da reação colorimétrica com o resorcinol terem apresentado absorbâncias que

ultrapassavam a faixa de leitura estabelecida para esse método. Mesmo com alíquotas muito pequenas da mistura reacional e das soluções de levana e de sacarose, as absorvâncias continuavam muito além da faixa de resolução, o que não se havia esperado, pelas razões citadas a seguir.

Da solução de sacarose, por exemplo, a alíquota adicionada foi de 0,25mL, que continha 0,171g de sacarose, a qual não é dosada por este método. A frutose que poderia estar presente nestes tubos seria apenas a proveniente da inversão natural da sacarose, mas a quantidade de frutose que esta inversão forneceria seria irrisória: a sacarose cristalizada contém cerca de 0,05% de açúcar invertido (AI), isto significa que estaria sendo adicionado nesta alíquota, $8,55 \cdot 10^{-5}$ g de AI, dos quais somente metade, ou seja, 43 μ g seriam frutose livre. Estes aproximados 43 μ g de frutose, por sua vez, gerariam na reação com o resorcinol uma coloração mínima, provavelmente com uma absorvância muito abaixo da faixa de leitura no espectrofotômetro e seria, portanto, irrisório, ou seja, não significativo.

Os tubos aos quais foram adicionadas apenas as soluções de levana como padrões também apresentaram colorações muito intensas, muito além da faixa de leitura do método, o que não deveria estar ocorrendo, uma vez que ambos os complexos foram lavados antes de serem utilizados. Para o método do DNSA não foram adicionados os padrões da solução de sacarose e de levana, mas pelas próprias amostras pode-se inferir o mesmo quando suas leituras são comparadas com as feitas pelo método de Roe & Papadopoulos (1954). Para as mesmas amostras, o método de Roe & Papadopoulos (1954) revelou colorações de uma absorvância muito elevada, fora da faixa, ao ponto de indicar concentrações de frutose muito superiores àquelas indicadas pelo método do DNSA. A concentração de frutose não pode ser superior à de ART em nenhuma das situações, a menos que tanto a sacarose quanto a levana estejam sendo hidrolisadas nas condições do método aplicado (1954). E apenas esse fato justifica a presença de tão elevadas concentrações de frutose na mistura reacional colorimétrica do método Roe & Papadopoulos (1954).

Observando-se apenas as leituras do DNSA, pode-se notar que o rendimento em ART dos grupos em que se utilizou o complexo recém produzido apresentou maiores concentrações que as dos grupos em que se utilizou o complexo liofilizado

(Tabela 6). No caso do grupo 5, a diferença foi de 17,6% e no caso do grupo 6, foi de 10,3%. Isso significa que, provavelmente, a levansacarase pertencente ao complexo recém-produzido apresentou uma atividade total maior que a presente no complexo liofilizado (Tabela 6). Portanto, o processo de liofilização parece modificar a enzima de forma que a prejudicar sua atividade. Provavelmente, o congelamento altera estruturalmente a enzima, e esta alteração se mantém após a retirada da água de solvatação por sublimação, sem que ela possa recuperar sua conformação original.

Tabela 6- Concentrações em g/L de ART nas amostras dos grupos 5 e 6 com levanas recém produzida e liofilizada.

GRUPO	Conc. (g/L) de ART
5 (complexo recém produzido)	1,23
5 (complexo liofilizado)	1,05
6 (complexo recém produzido)	1,23
6 (complexo liofilizado)	1,11

Por outro lado, a geração de ART pela permanência à temperatura de incubação após a adição do reagente de DNSA foi insignificante, principalmente para a levana recém produzida. Nas amostras dos grupos 5 e 6 da levana liofilizada, observou-se que a permanência a 30°C por 30 min antes de se levar ao banho-maria à temperatura de ebulição levou a um aumento de 6,2% na concentração de ART livre, um incremento muito pequeno, mas que pode ser considerado. Baseando-se nesta constatação, pode-se considerar duas hipóteses para o aumento do ART após 30 minutos de incubação da mistura reacional com o reagente: (1) o reagente não inativa completamente a enzima que, apesar de ter sua atividade muito desestimulada pelas condições impostas, continua a catalisar a formação de ART muito lentamente; ou (2) como o reagente é alcalino, a sacarose e/ou a levana podem ter sido hidrolisadas, embora muito lentamente por causa da temperatura de 30°C, que não favorece uma reação de hidrólise.

5.4. Recuperação dos FOS produzidos utilizando um sistema de partição em três fases (TPP)

Nos experimentos de partição em três fases, inicialmente foi testada a chamada levana total, precipitada do meio fermentado pela adição de etanol até uma concentração final de 75% na solução. O primeiro passo foi realizar um teste piloto, em tubos de ensaio, nos quais a separação de fases seria mais facilmente visualizada (Fig. 21). Neste, a terceira fase foi claramente formada, porém era muito larga, e não uma lâmina, como era esperado. Os testes seguintes, então passaram a ser realizados em tubos de Eppendorf, que foram submetidos a centrifugação (Fig. 22 e Fig 23).



Fig. 21- Primeiro teste realizado com levana total, sem centrifugação.



Fig. 22- Foto de um dos experimentos de TPP realizados com levana total antes da centrifugação. Os três primeiros são os tubos-teste e o último corresponde ao padrão negativo (sem levana).



Fig. 23- Foto de um dos experimentos de TPP realizados com levana total após a centrifugação. O primeiro tubo corresponde ao padrão negativo (sem levana) e os três últimos são os tubos-teste.

A centrifugação promoveu uma compressão da fase intermediárias dos sistemas de TPP, as quais, passaram a lembrar lâminas iterfaciais (Fig. 23).

Os experimentos de TPP com a levana total foram realizados em cinco temperaturas (30, 35, 37, 40 e 45°C) nas quais a levana apresentou concentrações diferentes nas três fases (Fig. 24 a 26).

Temperaturas altas como 37 ou 40°C foram selecionadas como melhores nos experimentos de TPP realizados com outros polissacarídeos, mesmo sendo testadas temperaturas mais baixas (Sharma & Gupta, 2002; Sharma *et al*, 2003; Mondal *et al*, 2004). Os experimentos realizados a 30, seguidos dos realizados a 37°C foram os que apresentaram melhores rendimentos.

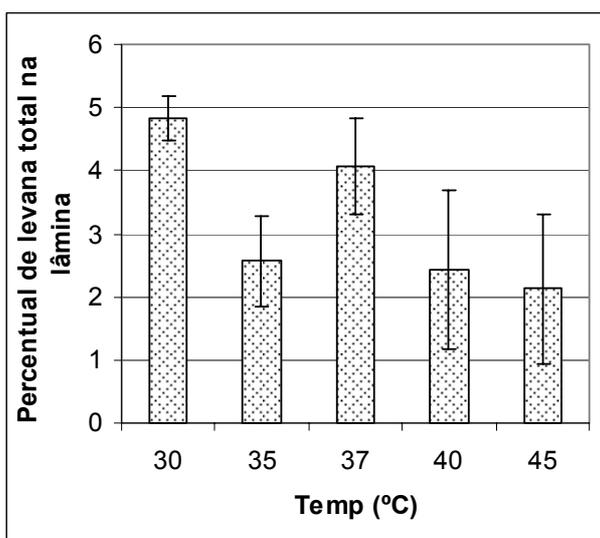


Fig. 24- Percentual da levana nativa que se concentrou na lâmina interfacial (terceira fase do sistema) em relação à total adicionada ao sistema. Experimentos realizados a diferentes temperaturas por 1h.

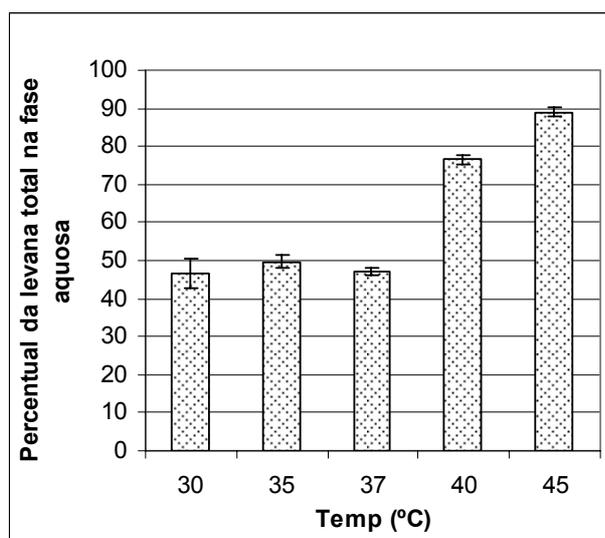


Fig. 25- Percentual da levana total adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na fase mais densa (aquosa, com sulfato de amônio a 45%). Experimentos realizados a diferentes temperaturas por 1h.

Os rendimentos das extrações da levana por TPP foram muito baixos, mas nem todo o polissacarídeo que deixou de estar na lâmina permaneceu na fase aquosa, pois a soma dos percentuais do polissacarídeo contido na fase aquosa e na fase intermediária não corresponde a 100% (Fig. 26). Considerando que somente há mais uma fase em que o restante do polissacarídeo poderia estar, a diferença representa o percentual que migrou para a fase orgânica. As três temperaturas mais baixas testadas (30, 35 e 37°C) foram as mais favoráveis à migração para esta fase, atingindo aproximadamente 48,6, 47,7 e 48,8% do total da levana adicionada ao sistema, respectivamente (Fig. 26).

O aumento da temperatura favoreceu a permanência do polissacarídeo na fase aquosa, possivelmente porque em sistemas com alta energia, a permanência do polissacarídeo na mesma fase do solvente orgânico com quatro carbonos ser muito instável. A alta energia do sistema pode ter favorecido o desdobramento da macromolécula com exposição de um maior número de hidroxilas, que permite a formação de mais ligações de hidrogênio. Desta maneira, as moléculas se tornaram mais hidrofílicas, apresentando maior afinidade pela fase aquosa que pela orgânica. E, apesar do sulfato ser um forte íon cosmotrópico, esta alta energia pode ter

permitido a desagregação de moléculas de água de sua cápsula de solvatação, as quais, livres, puderam solvatar mais moléculas do polissacarídeo.

Estudos complementares de otimização deverão ser realizados no sentido de avaliar a influência de outros parâmetros, como concentração de sulfato, proporção de t-butanol, forma de agitação do sistema, tempo de repouso do sistema, além do tempo e força centrífuga aplicada para a compressão da lâmina interfacial.

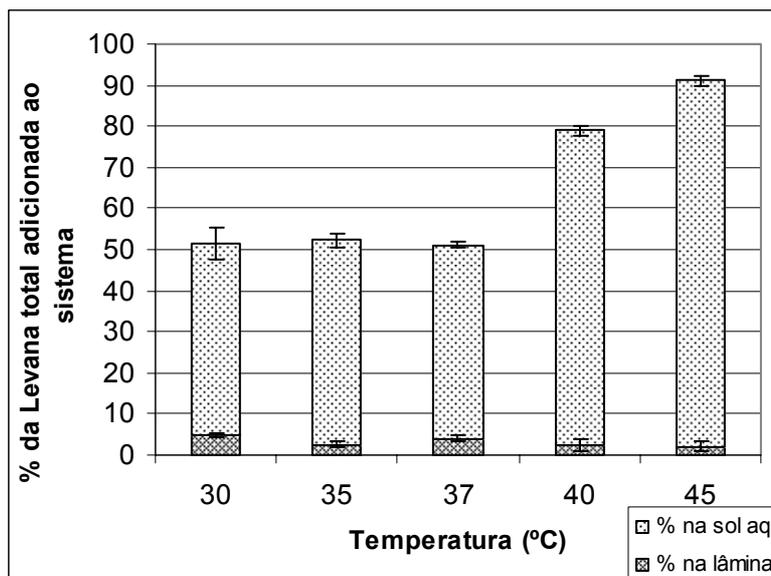


Fig. 26-Percentual da levana total adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial (terceira fase do sistema) e na fase densa (aquosa com 45% de sulfato de amônio). A diferença entre o somatório destes dois percentuais e a totalidade (100%) representa a fração de levana que se concentrou na fase leve (orgânica) do sistema.

Kiss *et al* (1998) traçaram uma curva de solubilidade em um diagrama de fases para os sistemas de TPP cujos componentes eram a água, o sulfato de amônio e o t-butanol, não levando em consideração o soluto (proteína ou polissacarídeo que permitiria a formação da terceira fase, concentrando-se nela). Para que este pudesse ser incluído em um diagrama, este último teria que ser quaternário, tendo a forma de uma pirâmide. As combinações dos componentes do sistema de TPP que resultariam em duas fases heterogêneas seria representada por uma região no interior da pirâmide e não por uma curva. O conjunto de combinações que resultariam em três fases seria representado por uma segunda região dentro da pirâmide, só que localizada dentro da primeira. Seria menor que esta última, uma

vez que nem todas as combinações que geram um sistema heterogêneo formam três fases.

O diagrama de fases quaternário é usado também para representar sistemas de microemulsões, onde tensoativo, co-tensoativo e água estão representados nos vértices do triângulo e o óleo na projeção bidimensional do mesmo (Oliveira *et al*, 2004).

As frações leves da levana (F-70, F-80 e F-90) foram testadas no sistema de TPP e, quanto mais leve era a fração, mais difícil se tornava a visualização e coleta da lâmina (Figs. 27, 28 e 29). A concentração dos sacarídeos usada nestes experimentos (3%) foi o dobro da usada para a levana total (1,5%). Esperava-se que, por se tratar de cadeias menores e, portanto, mais hidrossolúveis, estas frações seriam mais facilmente excluídas da fase aquosa para se concentrarem na lâmina interfacial. De fato, para a temperatura de 30°C, que apresentou melhores resultados para a levana total, apenas a F-70 apresentou rendimentos mais baixos (Fig 26). A F-80 foi melhor concentrada na lâmina a 30°C, temperatura na qual o sistema chegou a concentrar mais de 7% do total do carboidrato adicionado (Fig 27).

Para as frações F-70 e F-90, a melhor temperatura testada foi a de 40°C, embora o percentual de cada fração tenha sido muito diferente. Pouco mais de 4% da F-70 e, aproximadamente, 27% da F-90 se concentraram na fase intermediária (Figs 27 e 29).

O resultado obtido no teste de TPP para a F-90 a 40°C, no qual a fração foi bem mais concentrada que nas demais condições testadas, não era esperado, uma vez que: (1) em nenhum dos outros testes se atingiu sequer a metade desta concentração na lâmina, (2) é a fração da levana com o peso molecular médio mais leve testado e esperava-se, por este motivo, que apresentasse um poder de emulsificação menor que as demais.

Observando-se os resultados das três frações, pode-se notar que, quanto mais leve era a fração, maior era a sua concentração na lâmina. Isto pode estar ocorrendo porque a mesma massa de uma fração leve, com pequenas cadeias, requer uma maior quantidade de água de solvatação em relação às mais pesadas, com moléculas maiores. Ou seja, mais moléculas de água são necessárias, por exemplo, para solvatar 10 monossacarídeos, do que para solvatar uma cadeia de dez

unidades. Como o sulfato “aprisiona” em suas cápsulas de solvatação uma considerável quantidade de água e se encontrava em uma concentração próxima da saturação, pode-se esperar que as maiores moléculas testadas se adaptem melhor à fase densa sem serem expulsas desta por falta de água disponível para solvatá-las. Raciocinando-se deste modo, poder-se-ia esperar que o rendimento da TPP para a levana total fosse realmente menor.

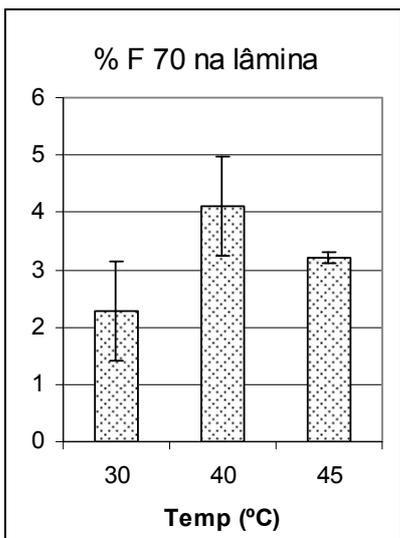


Fig. 27- Percentual da F-70 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial

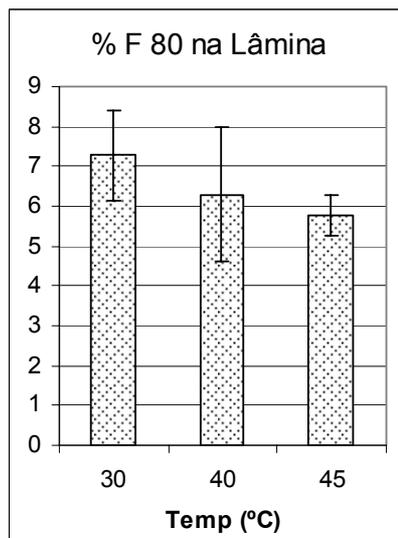


Fig. 28- Percentual da F-80 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial

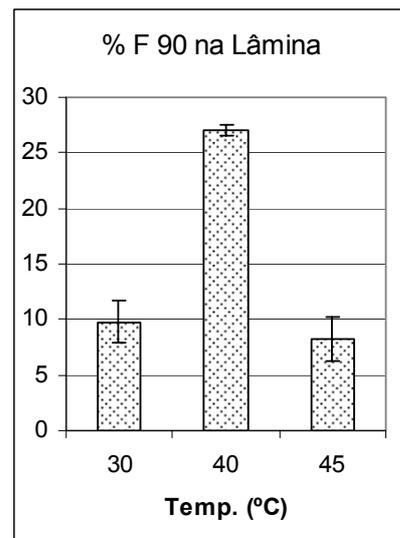


Fig. 29- Percentual da F-90 adicionada ao sistema de três fases que se concentrou na lâmina interfacial

A levana total foi obtida por precipitação a partir do meio fermentado pela adição de etanol até uma concentração de 75%, ou seja, contém parte da F-80, toda a F-70 e todas as frações com pesos moleculares médios mais elevados. Então, já que possui uma maior quantidade e variedade de macromoléculas que as frações testadas, uma maior parte do carboidrato total adicionado ao sistema deve permanecer na fase aquosa (Fig. 25). A presença de parte da levana na fase leve, orgânica, também é aceitável, pois são moléculas que, apesar de serem carboidratos, têm sua hidrofobicidade acentuada pelo tamanho da cadeia e pela conformação enovelada que podem apresentar, escondendo grupos polares. Além disso, a fase leve também é composta por certa quantidade de água, na qual tanto o álcool terciário quanto os polissacarídeos são solúveis. Assim, pode-se compreender

por que um alto percentual da levana total permaneceu na fase densa do sistema de TPP.

As fases leves dos sistemas de TPP também foram submetidas à reação com fenol e ácido sulfúrico pelo método de Dubois *et al* (1956) e desenvolveram cor, mas a formação de um precipitado, tornando a amostra turva, impossibilitou sua leitura por espectrofotometria e determinação segura do conteúdo de carboidratos.

5.5. Curvas de solubilidade das frações leves de levana

Quando se mistura água, etanol e levana, um sistema de três componentes (sistema ternário) é formado e o equilíbrio de fases neste sistema depende da massa molecular do polissacarídeo e do percentual de etanol em relação à massa total do sistema.

As várias possibilidades de sistemas ternários podem ser representadas por diagramas triangulares, cujos ângulos representam cada componente do sistema, puro, e os segmentos que ligam os ângulos representam a mistura dos dois componentes envolvidos. A região sob a curva representa todas as combinações dos três componentes que formam as duas fases e a área que fica fora da curva representa todas as combinações que formam um sistema homogêneo. Estas curvas, chamadas de bimodais, formam-se nos segmentos que ligam os componentes imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Entre os componentes completamente miscíveis não há misturas que resultem em um sistema heterogêneo (Coulson & Richardson, 1965).

No sistema etanol-água-levana, o etanol e a água são completamente miscíveis em todas as proporções, bem como levana e água, mas levana e etanol são imiscíveis. Assim, o etanol é um não-solvente da levana e, quando adicionado à solução aquosa desta última, tende a provocar sua precipitação. Só haverá, portanto, uma curva de solubilidade no diagrama traçado com este sistema ternário e esta se localiza sobre o segmento que liga o etanol à levana. Outra característica previsível desta curva é o fato de seu primeiro, bem como seu último ponto se localizarem nos vértices do triângulo correspondentes ao etanol e à água pura. Etanol e levana não são miscíveis em nenhuma proporção e, por isso, nenhum

trecho do segmento que liga um ao outro no diagrama pode representar uma mistura homogênea.

Embora a curva de solubilidade da levana total já ter sido traçada por Vinhas (1999), cada fração da levana pode apresentar comportamentos distintos da curva traçada para a levana total. A curva de solubilidade da levana total representa, provavelmente, o resultado das interações de todas as frações de que é composta, ou seja, parte da F-80, a F-70 e todas as frações mais pesadas. O traçado das curvas de solubilidade para cada fração pode evidenciar a tendência de cada curva e, conseqüentemente, a influência que cada fração pode estar exercendo na solubilidade da mistura de frações (levana total).

Neste trabalho não foram traçadas as curvas de solubilidade para todas as frações que compõem a levana total, recuperada do meio pela adição de etanol até a concentração de 75%. Diferente disto priorizou-se o estudo das curvas de solubilidade das frações mais leves, mais difíceis de serem recuperadas do meio aquoso. O conhecimento da curva de solubilidade destas frações facilita a recuperação das mesmas, uma vez que, baseando-se nos dados fornecidos por este estudo, pode-se planejar uma precipitação mais eficiente, de acordo com a concentração da fração na solução aquosa. Porém, a construção das curvas de solubilidade das demais frações de levana, é importante e viria complementar as informações fornecidas pelas curvas de solubilidade traçadas neste trabalho de dissertação.

Nas Figuras 30 a 33, tem-se representadas as curvas de solubilidade de frações leves de levana (F-70, F-80, F-90 e F >90, respectivamente). Em nenhum dos casos foi possível traçar a curva completa, uma vez que para construir o trecho mais próximo do vértice da fração, era necessário trabalhar com soluções muito concentradas das frações, que apresentavam viscosidades muito altas. Estas características da solução tornavam a homogeneização muito difícil. Ao se adicionar o etanol, o polímero da superfície da solução aquosa em contato com o não-solvente tornava-se insolúvel, formando uma “rede” que dificultava a difusão do etanol na solução aquosa, impossibilitando a uniformização da mistura. Já o trecho mais próximo do vértice do etanol não foi construído porque as frações da levana nestes pontos já se encontravam muito diluídas e a turvação era cada vez mais sutil até que

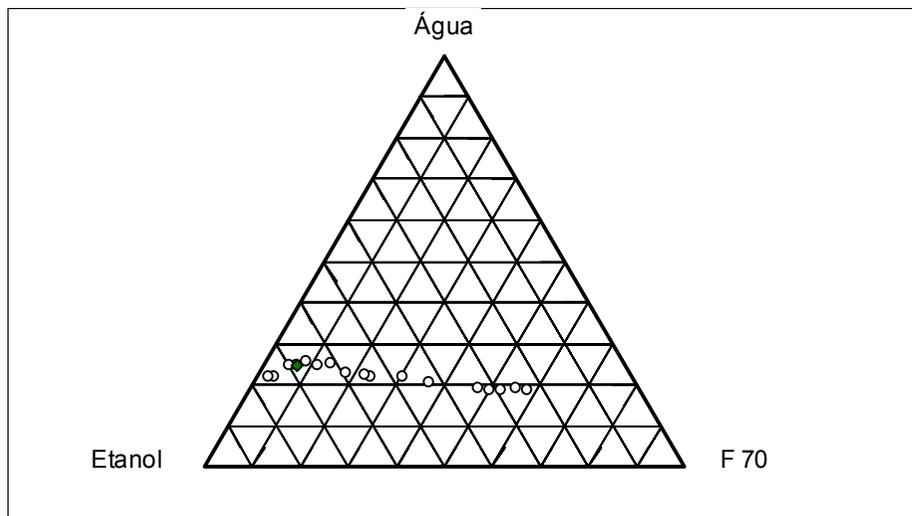


Fig 30- Diagrama de solubilidade da fração 70 da levana hidrolisada (F-70) e posterior fracionamento.

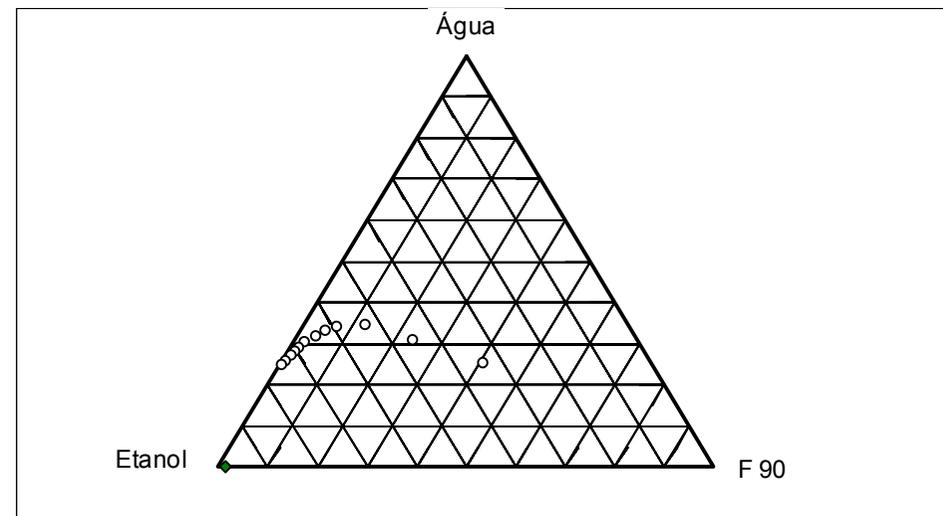


Fig 32- Diagrama de solubilidade da fração 90 da levana hidrolisada (F-90) e posterior fracionamento.

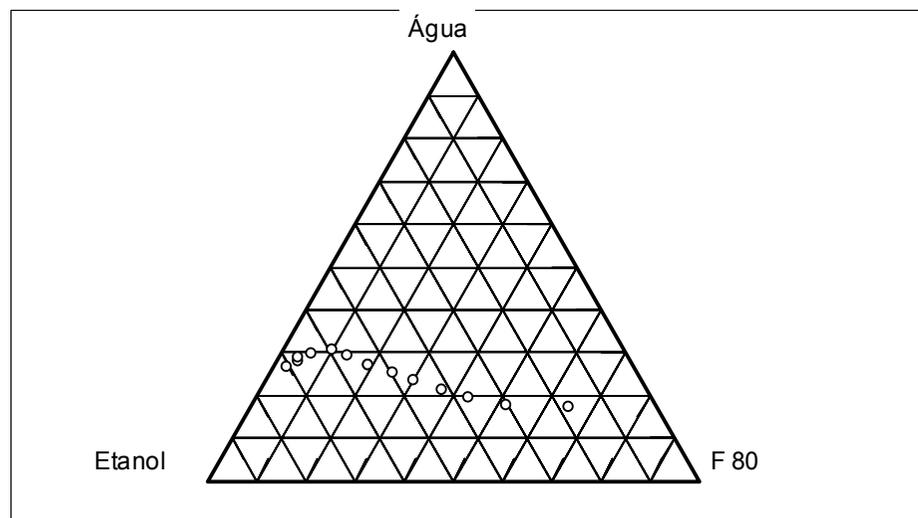


Fig 31- Diagrama de solubilidade da fração 80 da levana hidrolisada (F-80) e posterior fracionamento.

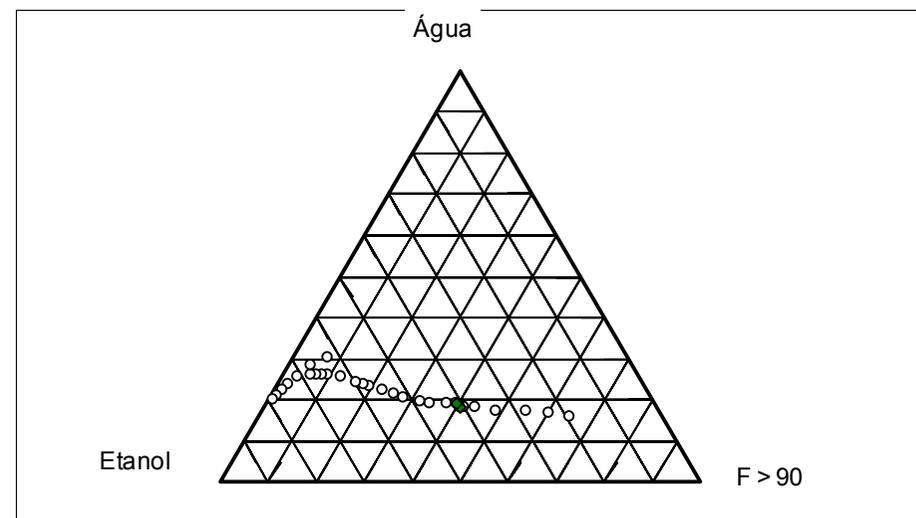


Fig 33- Diagrama de solubilidade dos açúcares não precipitáveis em solução aquosa com 90% (m/m) de etanol, oriundos da levana hidrlisada (F >90), obtidos por hidrólise e posterior fracionamento.

não era mais possível sua visualização. Apesar disso, é possível estimar matematicamente estes trechos, uma vez que se conhecem os pontos inicial e final da curva e a considerável porção que foi obtida experimentalmente permite a estimativa de sua tendência.

As curvas de solubilidade de todas as frações (Fig 30 a Fig 33) apresentaram uma tendência à inclinação no sentido do segmento água-etanol do diagrama e esta inclinação foi mais intensa quanto mais leve era a fração. Este comportamento permite a afirmação de que quanto menor é a concentração de levana no meio, mais facilmente ela é precipitável pelo etanol. Permite também a consideração de que este método, para todas as frações utilizadas parece ser bastante eficiente, uma vez que mesmo quando o soluto se encontra em baixas concentrações, a recuperação parece ser realizada satisfatoriamente. Apesar disso, dificulta a compreensão dos fatores que levam a esse comportamento, pois, teoricamente, quanto maior a proporção água/soluto, mais numerosas são as camadas de água de solvatação e mais difícil é o acesso das moléculas de etanol a ele. Assim, era de se esperar que maior fosse a quantidade necessária de etanol para envolver a água do sistema impedindo que esta pudesse entrar em contato com o soluto para solvatá-lo.

Foram observados também dois comportamentos que contrariam a expectativa dos perfis destas curvas de solubilidade (Figs. 30 a 32). O primeiro foi: a menor concentração de etanol necessária para a precipitação da F-70 (Fig. 30) é aproximadamente 66% (m/m), enquanto para a F-80 (Fig. 31) é de aproximadamente 59% (m/m) e para a F-90 (Fig. 32), mais leve, é de aproximadamente 53% (m/m). Ou seja, quando estas frações se encontram em concentrações de aproximadamente 10% no sistema, quanto mais leve é a fração, menos etanol é necessário para a sua precipitação. O outro comportamento foi o de que para precipitar a fração F >90 (Fig. 33) foi necessária uma concentração pouco maior que a menor necessária para precipitar a F-70 (Fig. 30). Assim sendo, as curvas construídas para as frações da levana seguiram uma ordem de solubilidade contrária à esperada, mas com um limite, pois a fração mais leve apresentou-se mais solúvel, contrariando a seqüência de comportamento das demais.

É possível que as diferentes frações de levana, ao serem submetidas a crescentes concentrações de etanol durante o fracionamento tenham sofrido mudanças conformacionais no sentido de tentar uma adaptação ao meio com etanol.

As frações sucessivamente mais leves permaneceram mais tempo em solução alcoólica, além de terem sido submetidas a concentrações crescentes de etanol (ou seja, a concentração de etanol necessária para tornar estas espécies insolúveis foi atingida lentamente). Por esse motivo, se a insolubilização destas moléculas é associada a uma mudança conformacional, então esta modificação deve ter sido mais lenta à medida que se tratava de frações menores. Por isso, estas espécies moleculares podem ter chegado a uma forma modificada mais estável e, conseqüentemente, mais difícil de ser revertida, tornando-se menos solúveis. Em contrapartida, quando as cadeias são muito curtas, contendo poucas unidades monossacarídicas como no caso dos oligossacarídeos, as opções, bem como a estabilidade de conformações alternativas são reduzidas. A formação ou manutenção de uma estrutura terciária modificada é praticamente impossível neste caso, pois as interações entre as unidades monossacarídicas resumem-se, praticamente, às ligações glicosídicas, com poucas ou nenhuma interação intermolecular não covalente.

Todas as curvas traçadas, com exceção da curva de solubilidade da F-90, apresentaram um trecho em que apenas eram variadas as concentrações de etanol e da fração, enquanto a concentração de água era, praticamente, constante. Para a F-70, o trecho se estende de aproximadamente 42% a aproximadamente 25% de etanol; para a F-80, se encontra entre aproximadamente 50 a 30% de etanol; e para a F >90 o trecho se estende de 50 a 40% de etanol; e a concentração de água que permanece constante para várias combinações deste sistema ternário é 20%.

Estes trechos de constância da concentração de água poderiam representar um erro experimental, uma vez que as curvas de solubilidade comumente vistas parecem não apresentar comportamentos deste tipo. Contudo, o grande número de pontos obtidos experimentalmente nestes trechos e que desenham este perfil da curva, além da reprodutibilidade destes dados, indicam que de fato há um trecho em cada uma delas em que a concentração da água no sistema é constante.

6. CONCLUSÕES

A melhor temperatura para a produção de FOS por via fermentativa, bem como para a atividade de transfrutossilação da levanassacarase nas condições ensaiadas é 40°C.

As melhores condições dentre as ensaiadas para a atividade de transfrutossilação da levanassacarase em meio de sacarose são 400g/L, pH 6,0 e 40°C.

Comparando-se as duas formas de produção, a via fermentativa ainda demonstra ser mais promissora do ponto de vista econômico.

É viável o investimento em estudos de otimização da atividade de transfrutossilação da levanassacarase para a produção de FOS, bem como das melhores condições para a produção da levanassacarase de *Z. mobilis*. Faz-se necessário o complemento do estudo destas condições, como o ajuste fino do melhor pH e a investigação da atividade de transfrutossilação da enzima em meios com maiores concentrações de sacarose.

O uso da levanassacarase recém-produzida em relação à sua forma liofilizada também deve ser considerada, uma vez que a recém-produzida apresentou uma melhor atividade a 30°C.

O reagente de DNSA é satisfatório para inativar a levanassacarase, porém o método não diferencia os teores de frutose e glicose, dados necessários para a distinção entre as atividades hidrolítica e polimerásica.

Estudos de otimização do método de partição em três fases serão necessários para a elevação dos rendimentos de recuperação do produto.

As curvas de solubilidade construídas para as frações leves de levana hidrolisada, apresentaram perfis que sugerem a necessidade de um estudo mais detalhado da biosseparação destas frações.

Com base nos dados obtidos, conclui-se que dificilmente a TPP será mais vantajosa que a precipitação com etanol, a menos que este tipo de purificação provoque mudanças estruturais desejadas nas cadeias.

O grande volume de etanol a ser gasto para a recuperação de cadeias curtas, pode ser reduzido, por uma etapa de evaporação e, conseqüente concentração da mistura hidroalcoólica resultante da precipitação da levana. Essa possibilidade torna ainda mais difícil a substituição do método de precipitação com etanol pelo de TPP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**. 99 (2002) 111-119.

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**. 36 (2001) 979-986.

BEKERS, M.; LAUKEVICKS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS, A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, 38 (2002) 701-706.

BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**. 40 (2005) 1535-1539.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; WEI-SHOU HU. *Biosseparations: downstream processing for biotechnology*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1988.

BENKEBLIA, N.; TAKAHASHI, N.; UENO, K.; ONODERA, S.; SHIOMI, N. Tetra- and penta-fructooligosaccharide (FOS) isomers assessment in onion bulb tissues: effect of temperature and storage time. **Tetrahedron: Assimetry**. 16 (2005) 33-37.

BIEDRZYCKA, E. & BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Food Science and Technology**. 15 (2004) 170-175.

BORNET, F. R. J. *et al.* Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. **Digest Liver DIS**. 34, 2. S111-20. 2002.

BORBÁS, R.; TURZA, S.; SZAMOS, J.; KISS, É. Analysis of Protein gels formed by interfacial partitioning. **Colloid Polymer Science**. 713 (2001) 279-705.

BORBÁS, R.; MURRAY, B. S.; KISS, É. Interfacial shear rheological behaviour of proteins in three-phase partitioning systems. **Colloids and Surfaces A**. 213 (2003) 93-103.

BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L.; ATTAR, A.; SALFATI, J.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; BORNET, F.; RAMBAUD, J-C. Short-chain Fructooligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. **American Society for Nutritional Sciences-Human nutrition and Metabolism**. (1999) 113-117.

CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C. & FRANÇA, F. P. 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, 19, 1:19-21.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. & LOPES, C. E. 2000. Molecular Weight and Antitumour Activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, 27, 245-247.

CALAZANS, G. M. T. Produção de Levana para uso Clínico. Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos na Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997, 112p. Tese de Doutorado.

CHAPLIN, M. Kosmotropes and Chaotropes. Disponível em <http://www.lsbu.ac.uk/water/kosmos.html>. Acesso em 15 jan. 2006.

CHEN, H.; LU, Y.; LIN, J.; KO, L. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. **Nutrition Research**. Vol 20, nº 12, 2000, pp 1725-1733.

CLÍNICA UNIVERSITÁRIA DE NAVARRA. Dicionário. Disponível em <http://www.viatusalud.com/diccionario.asp?S=M&P=59&T=2>. Acesso em 03 mar. 2006.

COIMBRA, C. G. O. Estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. Relatório final de iniciação científica, 2002.

COIMBRA, C. G. O. Estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. Relatório final de iniciação científica, 2003.

COIMBRA, C. G. O.; MELO, I.R.; PINHEIRO, I. O.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Estudo da Produção de frutoligossacarídeos por *Zymomonas mobilis* ZAG 12. XLII Congresso Brasileiro de Química, 2002, Florianópolis, anais; Associação Brasileira de Química.

COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. Tecnologia Química. Operações Unitárias. V. 2. 1965, 2ª edição. Fundação Calouste Guilbenkian.

CRITTENDEN, R. G. & DOELLE, H. W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology and Biotechnology**. 41, 3, 302-308. 1994.

DENNISON, C.; LOVRIENT, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. **Protein expression and purification**. 11, 149-161. 1997.

DE PAULA, V. C. Hidrólise ácida da levana em forno de Microondas. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos na Universidade federal de pernambuco, 2004.64p. Dissertação de Mestrado.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis*- Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**. 13 (1) 57-98 (1993).

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; ROBBERS, P. A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of sugars and Related substances. **Anal. Chem.** 28 (3): 350/356 (1956).

ENZYME COMMISSION. Enzyme EC numbers. EC (Enzyme Commission) numbers assigned by IUPAC-IUBMB. Disponível em http://www.genome.jp/dbget-bin/get_htext?ECtable+-f+T+w+ABC6DCDB22A5#L8. Acesso em 06 jun. 2006.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBERT, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, 32, 3, 237-243. 1997.

FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Purification and some properties of beta-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**. 54 (4): 913-9. 1990, A.

FUJITA, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; KITAHATA, S. Transfructosylation catalysed by beta-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. **Agricultural and Biological Chemistry**. 54 (10) 2655-2661. 1990.

GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. Vol 18, n° 2, pp 287-298, 2004-A.

GIBSON, G. R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**. 1 (2004-B) 25-31.'

GRAVES, R.; HILGERS, J.; FRITSCH, H. HAYES, D.; ROBERTSON, J. F. R. **The Breast**. 7, 181-186. 1998.

GRUBE, M.; BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA. IR-spectroscopic studies of *Zymomonas mobilis* and levan precipitate. **Vibrational Spectroscopy**. 28 (2002) 277-285.

HAMBLY, R. J.; SAUNDERS, M.; RIJKEN, P. J.; ROWLAND, I. R. Influence of dietary components associated with high or low risk of colon cancer on apoptosis in the rat colon. **Food and Chemical Toxicology**. 40. 801-808.2002.

HARIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Dietary Fibres may protector enhance carcinogenesis. **Mutation Research** 443 (1999) 95-110.

HATAKEYAMA, Y.; TAKEDA, H.; OOI, T. KINOSHITA, S. kinetic Parameters of β -fructofuranosidase from *Scopulariopsis brevicaulis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 81, 6, 518-523. 1996.

HESTRIN, S.; FEINGOLD, D. S.; AVIGAD, G. The Mechanism of Polysaccharide Production from Sucrose- Isolation and Probable structures of oligosaccharides formed from sucrose by a levansucrase system. **Biochemistry Journal**: 64 (1956) 351-361.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural and Biological Chemistry**. 52 (5) 1181-1187. 1988.

HIJUM, S. A. F. T. kinetics properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. **FEBS Letters**. 534 (2003)207-210.

HUGES, R.; ROWLAND, I. R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. **Carcinogenesis**. 22.1: 43-47. 2001.

JANG, K. ; SONG, K.; KIM, C. H.; VHUNG, B. H.; KANG, S. A.; CHUN, U.; CHOUE, R. W.; RHEE, S. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. 23: 339-344. 2001.

JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; ANTTILA, H.; ESSELSTROM, H.; TUOMAINEN, P.; SONTAG-STROHM, T. Hydrolysis of β -glucan. **Food Chemistry**. 97 (2006) 71-79.

KISS, E.; SZAMOS, J.; TAMÁS, B.; BORBÁS; R. Interfacial Behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-content water/tert-butanol systems. **Colloids and Surfaces A**. 142 (1998) 295-302.

KISS, É. & BORBÁS, R. Protein adsorption at liquid/liquid interface with low interfacial tension. **Colloids and Surfaces B**. 31 (2003) 169-176.

KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. **Carbohydrate Research**. 66, 1, 277-288. 1978.

L'HOMME, C.; PUIGSERVER, A.; BIAGINI, A. Effect of food-processing on the degradation of fructooligosaccharides in fruit. **Food Chemistry**. 82 (2003) 533-537.

MARX, S. P.; WINKLER, S.; HARTMEIER, W. Metabolization of β -(2,6)- linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. Federation of European Microbiological Societes. **Micrbiology Letters**. 182 (2000) 9, 163-169.

MELO, I. R. & CALAZANS, G. M. T. Efeito da concentração inicial de sacarose no inóculo para a produção de levana In: XL Congresso Brasileiro de Química, 2000, Recife, anais; Associação Brasileira de Química. P. 48.

MENG, G. & FUTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**. 10 (11), 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31,3: 426- 428. 1959.

MONDAL, K.;SHARMA A.; GUPTA M. N. Three phase partitioning of starch and its structural consequences. **Carbohydrate Polymers**. 56, 355-359. 2004.

NEUCHL, C.; MERSMANN, A. Fractionation of polydisperse dextran using ethanol. **Chemical Engineering Science**. Vol 50, N 6, 951-958. 1994.

NILSSON, U.; DAHLQVIST, A.; NILSSON, B. Cereal Fructosans: part 2- characterization and structure of wheat fructosans. **Food Chemistry**. 22 (1986) 95-106.

OHTA, A. Comparison of the nutritional effects of fructo-oligosaccharides of different sugar chains length in rats. **Nutrition Research**: 18, 109-120. 1997.

OLIVEIRA, A. G.; SACARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**. 27, 1, 131-138. 2004.

OSEGUERA, M. A. P.; GUERECA, L.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. **Appl MicrobiolBiotechnol** (1996) 45: 465-471.

OZIMEK, L. K.;VAN HIJUM, S. A. F. T.;VAN KONINGSVELD, G. A.; VA DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; DIJKHUIZEN, L. Site-directed mutagenesis study of the three catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* 121. **FEBS Letters** **560** (2004) **131-133**.

PARK, H. *et al.* Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium levaniformans* ATCC 15953. **Enzyme and Microbial Technology**. 32 (2003) 820.-827.

REISS, M. & HARTMEIER, W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, 4, 1: (1990) 69-75.

ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Advances in Experimental medicine and Biology**, 09: 211-219,1997.

ROBERFROID, M. B. Concepts in Functional Foods: The case of Inulin and Oligofructose. **American Society for Nutritional Sciences- Nutritional and Benefits of Inulin and Oligofructose**. (1999) 1398S-1401S.

ROBERFROID, M. B. Chicory Fructooligosaccharides and the Gastrointestinal tract. **Nutrition**, 16: 677-679, 2000.

ROE, J. H. & PAPADOPUOLOS, N. M. The determination of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, 210: 703-7. 1954.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Three-Phase Affinity Partitioning of Proteins. **Analytical Biochemistry**. 300 (2002) 11-14.

SAKAI, K.; OHTA, A.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T. The Effect of Short Chain Fructooligosaccharides in Promoting Recovery From Post-Gastrectomy Anemia is Stronger than of Inulin. **Nutrition Research**. 20 (2000) 403-412.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**. 39, 753-758. 2004.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**. 40, 1085-1088. 2005. A.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. **Journal of Food Engineering**. 68, 57-64. 2005. B.

SANGILIYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. 21: 179-182. 1999.

SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by *in vitro* mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry**, 36, 543-548. 2001.

SCHNEEMAN, O. B. Fiber, Inulin and Oligofructose: Similarities and Differences. **American Society for Nutritional Sciences- Nutritional and Benefits of Inulin and Oligofructose**. (1999) 1424S-1426S.

SCHWAB, C.; GÄNZLE, M. G. effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*. **Systematic and Applied microbiology**. 29 (2006) 89-99.

SCHWEITZER, P. A. Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers. Mc Graw-Hill Company. 1979.

SENTHIKUMAR, V.; BUSHBY, S. J. W.; GUNASEKARAN, P. Serine substitution for cysteine residues in levansucrase selectively abolishes levan forming activity. **Biotechnology Letters**. 25: 1653-1656. 2003.

SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. **Carbohydrate Polimers**, 48 (2002) 391-395.

SHARMA, A.; MONDAL K.; GUPTA, M. N. Some studies on characterization of three phase partitioned chitosan. **Carbohydrate Polimers**: 52 (2003) 433-438.

SILVEIRA, M. M.; WISBECK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L.; BERTASSO, M. JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**. 75 (1999) 99-103.

SIMON, P. M. Pharmaceutical oligosaccharides. **DDT**, 1 ,12 (1996) 522-528.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. Mini review. **FEMS Microbiology Letters**. 145, 301-307.1996.

STRICKLING, J. A.; HARMON, D. L.; DAWSON, K. A.; GROSS, K. L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**. 86 (2000) 205-219.

SUNITHA, K.; CHUNG, B. H.;JANG, K.;SONG, K; KIM, C. H.; RHEE, S. Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *E.coli*.**Protein Expression and Purification**. 18, 388-393. 2000.

SWINGS, J. & DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**. (1997) 1-46.

SZAMOS, J. & KISS, E. Three-Phase Partitioning of Crude Protein Extracts. **Journal of Colloid and Interface Science**. 170 (1995) 290-292.

TAJIMA, K.; UENISHI, N.; FUJIWARA, M. ERATA, T.; MUNEKATA, M.; TAKAI, M. The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and its structural analysis by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**. 305 (1) 117-122. 1997.

TÁMBARA, Y.; HORMAZA, J. V.; PÉREZ, C.; LEÓN, A.; ARRIETA, J.; HERNÁNDEZ, L. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. **Biotechnology Letters**. 21: 117-121. 1999.

TANAKA, T.; OI, S.; YAMAMOTO, T. the molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. **Journal of Biochemistry**. 87, 1, 297-303. 1980.

UKKONEN, P.; VARIS, K.; JERNFORS, M.; HERVA, E.; JOKINEN, J.; BUOKOKOSKI, E.; ZOPF, D.; KILPI, T. Treatment of acute otitis media with an antiadhesive oligosaccharide: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Lancet**. 356 (2000) 1398-402.

VAN DER MEULEN, R. AVONTS, L. DE VUYST, L. Short fractions of Oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. **Applied and Environmental Microbiology**. 2004. 1923-1930.

VIGANTS, A. *et al.*. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**. 20, 11 (1998) 1017- 1019.

VIKARI, L. By- Product Formation in Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*. Dissertation for the Degree of Doctor of Technology. Espoo. 1986.

VINHAS, G. M. Estudo da Produção e do Fracionamento de leanas produzidas por *Zymomonas mobilis*. Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos na Universidade Federal de Pernambuco, 1999. 66p. Dissertação de mestrado.

WANG, Q.; & FANG, Y. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. **Journal of Chromatography B**. 812 (2004) 309-324.

YAMAMOTO, Y. *et al.*. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **J. Nutr. Biochem**. 10: 13-18.

YANASE, H.; IWATA, M. NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K.; purification, Crystallization, and Properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 56 (8) 1335-1337, 1992.

YUN, J. W.; LEE, M. G.; SONG, S. K. Batch production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of β -fructofuranosidase

and glucose-oxidase. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 77, 2, 159-163. 1994.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides- Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology.** 19, p. 107- 117, 1996.

ZOPF, D.; ROTH, S. oligosaccharide anti-infective agents. **The Lancet.** 347, 1017-21. 1996.