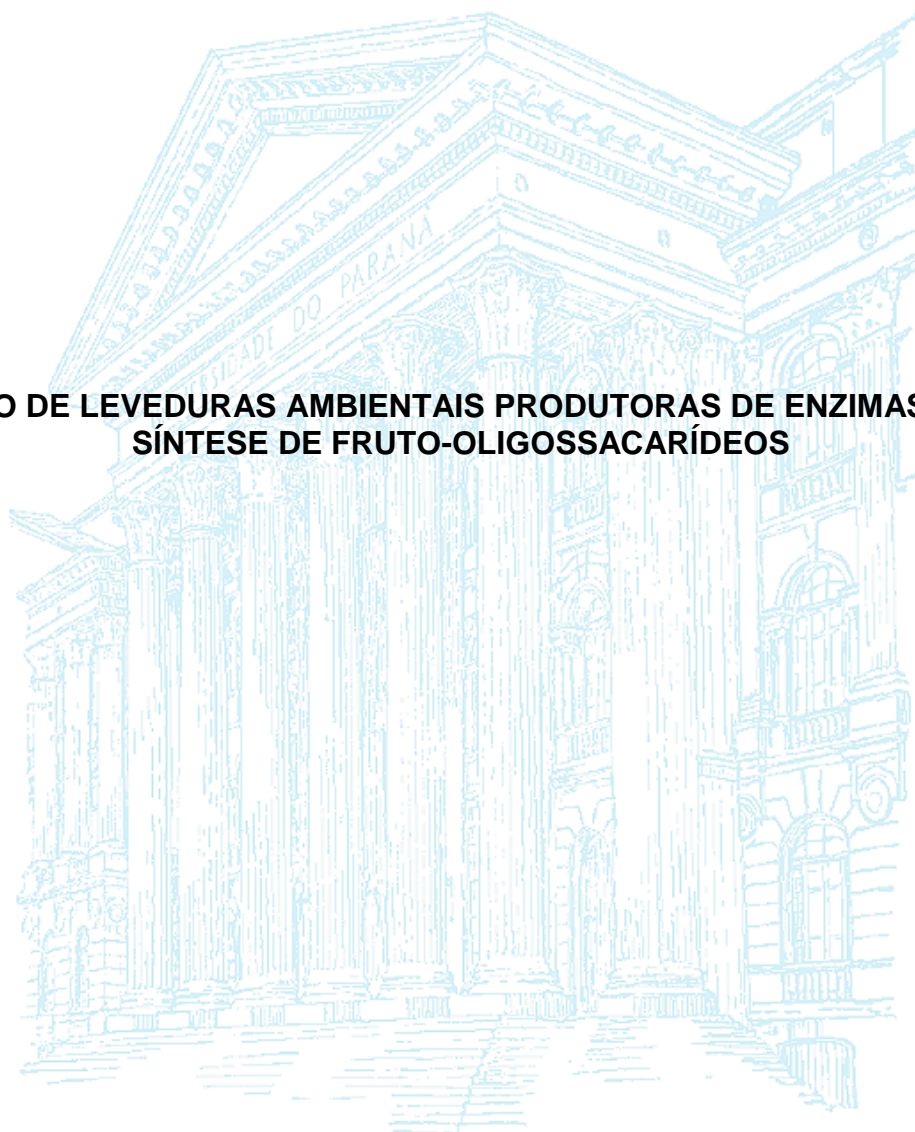


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA DEFFERT

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMBIENTAIS PRODUTORAS DE ENZIMAS PARA A
SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**



**CURITIBA
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA DEFFERT

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMBIENTAIS PRODUTORAS DE ENZIMAS PARA A
SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de Insumos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof.^a Tania Maria Bordin Bonfim



**CURITIBA
2015**

Deffert, Flávia

Seleção de leveduras ambientais produtoras de enzimas para síntese de fruto-
-oligossacarídeos / Flávia Deffert – Curitiba, 2015.

83 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Tnia Maria Bordin Bonfim

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. 1-Cestose. 3. Nistose. 4. MALDI-TOF. 5. PCR-RFLP.
I. Bonfim, Tânia Maria Bordin. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 664.024

TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIA DEFFERT

**Título: "SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMBIENTAIS
PRODUTORAS DE ENZIMAS PARA A SÍNTESE DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Profª. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora



Profª. Dra. Mareci Mendes de Almeida
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Alexandre Orsato
Faculdades Pequeno Príncipe

Curitiba, 12 de fevereiro de 2015.

*À Deus
Aos meus pais*

*“Ambas, a religião e a ciência da natureza,
envolvem, em seu exercício a afirmação de Deus.
Apenas acontece que, na religião, Deus está no começo.
E, para as ciências da natureza, Deus está no termo do raciocínio.
Para a religião, Deus é o fundamento.
Para as ciências, Ele é a coroa que remata o edifício das concepções científicas.”*
Max Planck

*“Quem tem fé, tem tudo;
Quem não tem fé, não tem nada.”*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná por ter proporcionado o ensino de graduação e pós graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, prof. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim, pela oportunidade deste trabalho, pelo conhecimento e ensino, pelo apoio, por acreditar em mim.

Ao professor Dr. Geraldo Picheth pela orientação nas análises estatísticas e paciência.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, na pessoa do pesquisador Dr. Luciano Paulino da Silva, por ter proporcionado à identificação das leveduras pela técnica de espectroscopia de massa MALDI-TOF.

À EMBRAPA Uva e Vinho, nas pessoas do pesquisador Dr. Gildo Almeida da Silva e da analista Dra. Bruna Carla Agustini, por ter proporcionado a identificação das leveduras empregadas neste trabalho por técnicas de biologia molecular.

Ao Departamento de Nutrição, na pessoa da professora Dra. Claudia Krüger, por ter prontamente disponibilizado o equipamento de cromatografia em fase líquida de alta eficiência, sem o qual seria possível realizar este trabalho.

À Ms. Maria das Graças e Dr. Mauricio Passos, pela ajuda nas análises de cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

Aos professores Dra. Francinete Ramos Campos, Ms. Maria Madalena Gabriel, Dr. Ricardo Wagner e Dra. Sandra Barreira que me ensinaram, me ajudaram e disponibilizaram materiais para a realização deste trabalho.

À Fernanda Gaensly, Rossana Calegari e Paola Augusta Yaegashi Paludo dos Santos pelo companheirismo e pela ajuda.

À professora Dra. Debora Brand e aos colegas do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, por toda a ajuda que foi me dada, risadas e convivência em todo o período em que estive presente.

Aos amigos e pessoas queridas, pelo incentivo, conselhos, paciência e fé depositada em mim para a realização deste trabalho.

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos são carboidratos que apresentam uma molécula de sacarose e uma ou mais unidades frutose ligadas à ela. O consumo destes açúcares beneficia a multiplicação celular de micro-organismos benéficos do trato gastrointestinal auxiliando a manutenção da saúde e aumento do bem-estar do hospedeiro. Os fruto-oligossacarídeos podem ser produzidos pelo emprego das enzimas β -frutofuranosidase e/ou frutotransferase. Estas enzimas realizam a ligação de uma ou mais unidades de frutose à uma molécula de sacarose. Em virtude de que as leveduras, diferentemente dos outros micro-organismos, foram pouco exploradas para a produção de fruto-oligossacarídeos e de que os micro-organismos ambientais estão expostos a diferentes fatores de estresse como diferenças na disponibilidade de água e de pressão osmótica, modificando sua fisiologia para adaptar-se ao ambiente, as leveduras ambientais tornam-se um interessante objeto de estudo para a obtenção de fruto-oligossacarídeos. O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras ambientais capazes de sintetizar fruto-oligossacarídeos e identificar o seu gênero e espécie. Dentre as 141 leveduras ambientais avaliadas em solução de sacarose 500 g.L^{-1} , valor de pH inicial de $4,5 \pm 0,2$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm , 65 leveduras formaram o fruto-oligossacarídeo 1-kestose. As leveduras foram selecionadas por cromatografia em camada delgada e o carboidrato identificado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. A formação de fruto-oligossacarídeos pelas oito leveduras selecionadas foi avaliado nas temperaturas de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \text{ }^\circ\text{C}$, nos valores de pH de 4,5; 5,5 e 6,5. Em seis horas de reação, a levedura 225, na temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e valor de pH de 4,5, formou $23,47 \pm 1,88 \text{ g.L}^{-1}$ de 1-kestose e a levedura 222, formou $3,90 \pm 2,56 \text{ g.L}^{-1}$ de 1-kestose e $14,89 \pm 0,39 \text{ g.L}^{-1}$ de nistose, na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e valor de pH 4,5. As leveduras selecionadas foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* por meio das técnicas de espectrometria de massa MALDI-TOF e PCR-RFLP.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*. 1-kestose. Nistose. MALDI-TOF. PCR-RFLP.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides are carbohydrates that have a sucrose molecule and one or more fructosyl units linked to it. The consumption of these sugars increases multiplication of beneficial microorganisms cells in the gastrointestinal tract aiding the maintenance of health and the host's well-being. The fructooligosaccharides may be produced by the use of the β -fructofuranosidase and/or fructosyltransferase enzymes. These enzymes carry out the linkage of one or more fructose units to a sucrose molecule. Yeasts, unlike others microorganisms, were little exploited for producing fructooligosaccharides and, else, environmental micro-organisms are exposed to various stress factors such as differences in the availability of water and osmotic pressure, changing their physiology to adapt to the environment. So, wild yeasts become an interesting object of study for obtaining fructooligosaccharides. The objective of this work is to select environmental yeasts capable of synthesizing fructooligosaccharides and identify its genus and species. Of the 141 yeast environmental evaluated in sucrose solution 500 g l^{-1} , initial pH value of 4.5 ± 0.2 , $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm , 65 yeasts formed the fructooligosaccharide 1-kestose. The yeasts were selected by thin layer chromatography and the carbohydrate was identified by high efficiency liquid chromatography. The formation of fructooligosaccharides by the eight selected yeasts was evaluated at temperatures of $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and $60 \text{ }^\circ\text{C}$ at pH 4.5; 5.5 and 6.5. Within six hours of reaction, the yeast 225 formed $23.47 \pm 1.88 \text{ g.L}^{-1}$ of 1-kestose, at a temperature of $60 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH 4.5, and yeast 222 formed $2.56 \pm 3.90 \text{ g.L}^{-1}$ 1-kestose and $14.89 \pm 0.39 \text{ g.L}^{-1}$ of nystose, at temperature of $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and pH value of 4.5. The selected yeasts were identified through the techniques of MALDI-TOF mass spectrometry and PCR-RFLP as *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. 1-kestose. Nystose. MALDI-TOF. PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS 1-CESTOSE (a), 6-CESTOSE (b) E NEOCESTOSE (c).....	18
FIGURA 2 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE REVERSA CATALISADA PELA ENZIMA β -FRUTOFURANOSIDASE.....	23
FIGURA 3 - REAÇÃO DE TRANSGLUCOSILAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA β -FRUTOFURANOSIDASE.....	24
FIGURA 4 - TRANSFERÊNCIA DA FRUTOSE CATALISADA PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE	25
FIGURA 6 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO PARA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA SECA ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) DA SUSPENSÃO.....	39
FIGURA 7 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	41
FIGURA 8 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA EMPREGANDO FASE MÓVEL N-BUTANOL: ÁCIDO ACÉTICO: ÁGUA (5:4:1) E 2% ÁCIDO SULFÚRICO EM METANOL COMO SOLUÇÃO REVELADORA DAS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO UTILIZANDO CÉLULAS INTEIRAS DE LEVEDURAS E 500 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DE SACAROSE COMO MEIO REACIONAL, pH INICIAL DE $4,5 \pm 0,2$, TEMPERATURA DE 50 °C, AGITAÇÃO 150 rpm.....	49
FIGURA 9 – NÚMERO DE LEVEDURAS FORMADORAS DE TRISSACARÍDEOS NOS TEMPOS 3, 6, 9, 12 HORAS DE REAÇÃO EMPREGANDO SOLUÇÃO DE SACAROSE 500 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (p/v), pH INICIAL $4,5 \pm 0,2$, CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS 28 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50°C, 150 rpm E A TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A VERIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS.	50
FIGURA 10 - CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE DETERMINADAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E OBTIDAS POR AÇÃO DAS ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASE OU β -FRUTOFURANOSIDASE DAS LEVEDURAS AMBIENTAIS NAS CONDIÇÕES DE INÓCULO DE 28 mg DE CÉLULAS SECAS. mL^{-1} DE MEIO REACIONAL CONSTITUÍDO DE 500 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH $4,5 \pm 0,2$, 50 °C, 150 rpm.	55
FIGURA 12 – CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) NAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO EMPREGANDO OS VALORES DE pH DE 4,5, 5,5 E 6,5 E AS	

TEMPERATURAS DE 40 °C, 50 °C E 60 °C PELAS LEVEDURAS 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225, 283.	59
FIGURA 13 - RESULTADO DA ELETROFORESE DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EMPREGANDO OS PRIMERS ITS 1 E ITS 4 PARA AS LEVEDURAS 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225 E 283.	68
FIGURA 14 - RESULTADO DA ELETROFORESE DA RESTRIÇÃO COM ENZIMA <i>HaeIII</i> DO PRODUTO DA REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE EMPREGANDO PRIMERS ITS 1 E ITS 4.....	69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - FASES MÓVEIS E SOLUÇÕES REVELADORES AVALIADAS PARA A ANÁLISE QUALITATIVA POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	40
QUADRO 2 - MEIO REACIONAL EMPREGADO PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA NA REAÇÃO DE PCR.....	45
QUADRO 3 - TEMPOS DE RETENÇÃO RELATIVO, FAIXA DE CONCENTRAÇÃO QUANTIFICADA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA CADA PADRÃO	53
QUADRO 4 - RELAÇÃO ENTRE A DENOMINAÇÃO NUMÉRICA DA LEVEDURA, A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E O ÍNDICE DE LOG SCORE	67
TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE (g.L ⁻¹) PARA CADA LEVEDURA SELECIONADA EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS pH e TEMPERATURA	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CHCA - ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ETS – espaçadores transcritos externos (do inglês, *External Transcribed Spacers*)

ITS – espaçadores internos transcritos (do inglês, *internal transcribed spacer*)

LSU – subunidade maior do rDNA (do inglês, *large-subunit rDNA*)

MALDI-TOF- espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*).

NTS – regiões não transcritas (do inglês, *Non-Transcribed Spacers*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

rDNA – DNA ribossomal

RFLP – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*)

rRNA – RNA ribossomal

SSU – subunidade menor do rDNA (do inglês, *small-subunit rDNA*)

TBE - solução tampão constituída de TRIS, ácido bórico e EDTA

TRIS – trisaminometano

YEPD – meio de cultura com extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês, *yeast extract-peptone-dextrose*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	17
3.2 ENZIMAS MICROBIANAS PARA FORMAÇÃO DE FRUTO- OLIGOSSACARÍDEOS	21
3.3 OBTENÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO MICRO- ORGANISMOS.....	26
3.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	35
4.2 ATIVAÇÃO	35
4.3 CONSERVAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	36
4.4 CRESCIMENTO CELULAR	36
4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS	37
4.6 SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMBIENTAIS PRODUTORAS DE ENZIMAS COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA E DE TRANSFRUTOSILAÇÃO	37
4.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS pH E TEMPERATURA PARA AS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DAS ENZIMAS DAS LEVEDURAS SELECIONADAS.....	38
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	39
4.8.1 Determinação da concentração celular	39
4.8.2 Verificação da formação de oligossacarídeos por cromatografia em camada delgada.....	40
4.8.3 Quantificação de Carboidratos por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência.....	41
4.9 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS.....	43
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE OU β -FRUTOFURANOSIDASE	47
5.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS pH E TEMPERATURA PARA AS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DAS ENZIMAS DAS LEVEDURAS SELECIONADAS.....	56
5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS.....	66
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Os fruto-oligossacarídeos são carboidratos constituídos de uma molécula de sacarose ligada a uma ou mais moléculas de frutose por ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 1) ou β -(2 \rightarrow 6) entre a unidade frutossil e a frutose da molécula de sacarose e a ligação glicosídica β -(2 \rightarrow 6) entre a unidade frutossil e a glucose da molécula de sacarose. São classificados como semelhante à inulina, ao levan e neofru-oligossacarídeos (HIDAKA *et al.*, 1990; KILIAN *et al.*, 1996; LINDE *et al.*, 2009; SABATER-MOLINA *et al.*, 2009).

Estes carboidratos são empregados como prebióticos, ou seja, são substâncias não ou parcialmente absorvidas pelo trato gastrointestinal humano e seletivamente fermentadas pelos micro-organismos benéficos presentes no trato gastrointestinal. Os fruto-oligossacarídeos aumentam o metabolismo e a multiplicação celular destes micro-organismos, exercendo efeitos benéficos à saúde e bem-estar do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2007).

Os fruto-oligossacarídeos podem ser obtidos por meio da hidrólise ácida ou enzimática de polissacarídeos como a inulina e o levan ou pela polimerização da molécula de sacarose, realizada por meio das enzimas β -frutofuranosidase ou frutossiltransferase, presentes em plantas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005b; ARRIZON *et al.*, 2012).

As enzimas β -frutofuranosidase ou frutossiltransferase são glicoproteínas contendo de 20 a 50% de carboidratos e, dependendo de sua origem, podem se apresentar como monômeros ou oligômeros. Sua atividade também é relativa à origem e apresentam regioseletividade característica (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

A enzima β -frutofuranosidase necessita de uma concentração de sacarose mínima para a realização da atividade de transfrutosilação. Por sua vez, a frutossiltransferase não depende da concentração do substrato para a realização de sua atividade (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; YOSHIKAWA *et al.*, 2008).

Entre os micro-organismos produtores das enzimas β -frutofuranosidase ou frutossiltransferase estão as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (TIAN; KARBOUNE, 2012) e *Bacillus macerans* (PARK; OH; YUN, 2001), os fungos filamentosos *Aspergillus niger* (OKU; TOKUNAGA; HOSOYA, 1984), *Aspergillus oryzae* (OTTONI

et al., 2012) e *Aspergillus japonicus* (YANG *et al.*, 2008), e as leveduras *Rhodotorula daiarensis* (GUTIÉRREZ-ALONSO *et al.*, 2009), *Schwanniomyces occidentalis* (ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2007) e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (LINDE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

Em virtude de que as leveduras, diferentemente dos outros micro-organismos, foram pouco exploradas para a produção de fruto-oligossacarídeos e de que os micro-organismos ambientais estão expostos a diferentes fatores de estresse como diferenças na disponibilidade de água e de pressão osmótica, modificando sua fisiologia para manter a homeostase, as leveduras ambientais tornam-se um interessante objeto de estudo para a obtenção de fruto-oligossacarídeos (MARX; WINKLER; HARTMEIER, 2000; NISHIZAWA; NAKAJIMA; NABETANI, 2001; MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007; LINDE *et al.*, 2009).

2. OBJETVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e identificar as leveduras produtoras das enzimas frutotransferase e/ou β -frutofuranosidase e estabelecer os parâmetros de pH e temperatura para a formação de fruto-oligossacarídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a concentração de sacarose, concentração de células e o tempo para as reações de transfrutoseilação da sacarose;
- Detectar as leveduras capazes de formar oligossacarídeos;
- Identificar e quantificar os oligossacarídeos;
- Verificar a influência dos parâmetros de reação temperatura e pH na formação dos fruto-oligossacarídeos;
- Identificar as leveduras formadoras de fruto-oligossacarídeos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os fruto-oligossacarídeos são carboidratos constituídos de uma unidade de sacarose com uma ou mais unidades frutossil ligadas à ela. As novas ligações glicosídicas formadas classificam os fruto-oligossacarídeos em semelhantes a inulina, semelhantes ao levan e neofruto-oligossacarídeos.

Os fruto-oligossacarídeos semelhantes à inulina apresentam ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 1) entre a unidade frutossil e a frutose da molécula de sacarose. Os semelhantes ao levan apresentam ligações β -(2 \rightarrow 6) entre a unidade frutossil e a frutose da molécula de sacarose. Por sua vez, os neofruto-oligossacarídeos apresentam ligações glicosídicas β -(2 \rightarrow 6) entre o radical frutossil e a glucose da molécula de sacarose (HIDAKA *et al.*, 1990; KILIAN *et al.*, 1996; LINDE *et al.*, 2009; SABATER-MOLINA *et al.*, 2009).

As moléculas mais simples de fruto-oligossacarídeos são constituídas de uma molécula de sacarose e uma molécula de frutose, sendo elas: 1-cestose [α -D-glucopyranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranose], 6-cestose [α -D-glucopyranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranosil-(6 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranose] e neocestose [O- β -D-fructofuranosil-(2 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranose] (FIGURA 1).

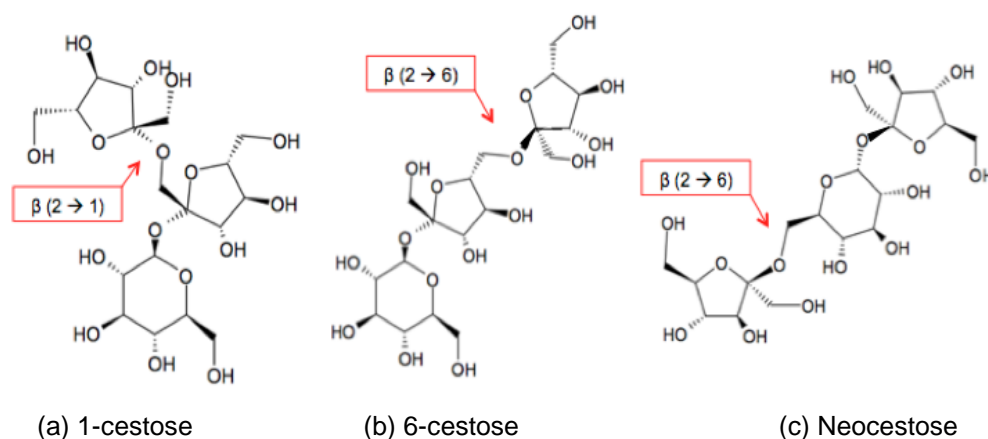


FIGURA 1 – FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS 1-CESTOSE (a), 6-CESTOSE (b) E NEOCESTOSE (c)

Nota: Estão destacadas as ligações glicosídicas características dos fruto-oligosacarídeos semelhantes a inulina (a), ao levan (b) e neofruto-oligosacarídeo (c)

FONTE: O Autor (2015)

Os fruto-oligosacarídeos são empregados como prebióticos. Os prebióticos foram definidos como ingredientes alimentícios que estimulam o crescimento e/ou o metabolismo de uma ou mais bactérias benéficas da flora intestinal, exercendo efeitos benéficos sobre a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Em 2004 foram estabelecidos os seguintes critérios para que uma substância possa ser considerada um prebiótico: resistência ao ácido gástrico e enzimas; não ser absorvido pelo trato gastrointestinal; ser fermentescível pelos micro-organismos do trato gastrointestinal; e estimular seletivamente o crescimento ou metabolismo dos micro-organismos intestinais associados à saúde e ao bem estar do hospedeiro (GIBSON *et al.*, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece como probióticos as bactérias *Lactobacillus acidophillus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* em uma quantidade mínima de 10^8 ou 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC). A ANVISA também define simbióticos como um único produto que apresenta prebiótico e probiótico; sendo assim, estes

produtos apresentam propriedades que reúnem os benefícios do uso de cada um separadamente (ANVISA, 2002).

No organismo humano, os principais micro-organismos que são estimulados à multiplicar-se e à aumentar o seu metabolismo pela utilização de prebióticos são do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, mas, também, os dos gêneros *Bacteroides* e *Candida*; e espécies *Clostridium coccoides* e *Eubacterium rectale*. Autores afirmam que ocorre a necessidade do estímulo de todos os micro-organismos benéficos ao organismo a fim de que possa haver equilíbrio da flora intestinal e consequente aumento dos efeitos positivos sobre o organismo humano (ROBERFROID, 2007; MACDONALD *et al.*, 2011; QUIGLEY, 2011).

A ação dos fruto-oligossacarídeos no organismo humano acontece devido aos produtos de fermentação gerados pelas bactérias do trato gastrointestinal. Elas produzem sais de ácidos graxos de cadeia curta no organismo, butirato, propionato e acetato, como produtos finais de seu metabolismo. Estes sais de ácidos graxos de cadeia curta são rapidamente absorvidos pelo intestino grosso e metabolizados pelo organismo humano, o butirato é metabolizado pelos colonócitos, no intestino; já, o propionato e o acetato são metabolizados no fígado e tecido muscular. Estes sais de ácidos graxos apresentam o potencial de reduzir a gluconeogênese; diminuir o pH intestinal, inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos no intestino, protegendo-o contra câncer, e participar do fornecimento de energia, atuando como reguladores do crescimento e diferenciação celular (SABATER-MOLINA *et al.*, 2009; VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2009).

Cummings *et al.* (2001) verificaram que a utilização em conjunto de fruto-oligossacarídeos e probióticos resultou em um efeito protetor contra infecções gastrointestinais, como a “diarreia do viajante”. Estas infecções são causadas por bactérias que colonizam primeiramente o intestino delgado, e, em seguida, o intestino grosso, local de crescimento dos micro-organismos estimulados pelos prebióticos (CUMMINGS; CHRISTIE; COLE, 2001).

O consumo de fruto-oligossacarídeos também auxilia na absorção de minerais em cobaias. Em estudo realizado por Wang *et al.* (2010), avaliou-se a absorção de minerais (cálcio, ferro, magnésio e zinco) na dieta suplementada por fruto-oligossacarídeos em ratos Kung-Ming. Esta dieta possibilitou uma maior absorção destes minerais quando as concentrações de fruto-oligossacarídeos foram de 0,8 g e 2,5 g por quilograma do rato. Além disso, a dieta suplementada foi capaz

de inibir o efeito antinutricional do ácido fítico, presente em sementes como o trigo, arroz e aveia.

Os fruto-oligossacarídeos são livres de calorias, não são cariogênicos, apresentam baixa intensidade de doçura e são semelhantes às fibras solúveis (SABATER-MOLINA *et al.*, 2009).

Os fruto-oligossacarídeos podem ser obtidos por meio da hidrólise ácida e enzimática de polissacarídeos, como também pela polimerização da sacarose por meio do emprego de enzimas microbianas.

A hidrólise ácida utiliza polissacarídeos e ácidos como o sulfúrico, o fosfórico e o cítrico, em valores de pH abaixo de 7,0 e temperaturas acima de 75 °C. Os polissacarídeos empregados são a inulina e o levan, geralmente obtidos de plantas como cebola, aspargo, alho, trigo, banana, tomate, dália e a chicória (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005a; FONTANA *et al.*, 2011)

Em plantas, a concentração dos polissacarídeos é variável de acordo com as safras, já que depende das condições ambientais em que a planta foi exposta. Em estudo realizado com três cultivares de *Helianthus tuberosus* (girassol batateiro ou tupinambo) da região sul da Lituânia, foi verificado que nos meses de maio a agosto (período de primavera e verão) houve queda na concentração e no grau de polimerização dos fruto-oligossacarídeos destas plantas visto que estes carboidratos participam da reserva energética delas (YUN, 1996; KRIVOROTOVA; SEREIKAITÉ, 2014).

A hidrólise da inulina e do levan também é realizada por meio do emprego de enzimas β -frutofuranosidasas com atividade de fructanase. A atividade fructanase consiste na hidrólise destes carboidratos com alto grau de polimerização para a formação de fruto-oligossacarídeos, dissacarídeos ou monossacarídeos. A atividade destas enzimas apresenta limitações em relação a presença de ramificações e ao tipo de ligação glicosídica, β -(2 \rightarrow 1) ou β -(2 \rightarrow 6), presente no polissacarídeo; bem como, ao seu grau de polimerização (ARRIZON *et al.*, 2012).

Arrizon *et al.* (2012) realizaram a seleção de leveduras não-*Saccharomyces* isoladas da planta *Agave tequilana* que apresentassem β -frutofuranosidasas com a capacidade de hidrolisar frutanos (polissacarídeos semelhantes à inulina) presentes nesta planta. Os frutanos hidrolisados dão origem aos fruto-oligossacarídeos que podem ser comercializados ou empregados na fermentação da *Agave tequilana*, para que posteriormente à destilação, dê origem à tequila. Segundo os autores, o

emprego de micro-organismos para a realização da hidrólise dos polissacarídeos é um método que é mais barato em comparação aos químicos. Como substrato para a avaliação da hidrólise dos polímeros de carboidratos, os autores utilizaram frutanos de agave, inulina e levan, para verificar qual ligação glicosídica as leveduras hidrolisavam, β -(2 \rightarrow 1) ou β -(2 \rightarrow 6). As leveduras *Candida apícola* e *Candida boidinii* apresentaram boa capacidade de hidrólise de levan; enquanto, as leveduras *Candida albida* e *Torulospirula delbrueckii* apresentaram hidrólise de inulina e frutanos derivados da *Agave tequilana*.

Outras pesquisas, mostraram o potencial de produção de fruto-oligossacarídeos a partir de polissacarídeos empregando outros micro-organismos como as bactérias *Streptomyces sp.* CP01, *Zymomonas mobilis* e *Staphylococcus sp.*, as leveduras *Kluyveromyces fragilis* e *Kluyveromyces marxianus*, e o fungo filamentoso como *Aspergillus niger* (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999; SZAMBELAN; NOWAK; CZARNECKI, 2004; KANGO, 2008; LAOWKLOM; CHANTANAPHAN; PINPHANICHAKARN, 2012).

A obtenção de fruto-oligossacarídeos também pode ser realizada pelo emprego de enzimas denominadas β -frutofuranosidases e/ou enzimas frutossiltransferases por meio da polimerização da molécula de sacarose (YOSHIKAWA *et al.*, 2008). Estas enzimas estão presentes em plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras e podem apresentar maior ou menor capacidade de formação de fruto-oligossacarídeos (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

3.2 ENZIMAS MICROBIANAS PARA FORMAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Desde a primeira descrição da enzima β -frutofuranosidase isolada de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 1860 por Berthelot, em que se demonstrou a hidrólise da sacarose em glucose e frutose, antes só conhecida pela hidrólise ácida, mais de 150 anos se passaram. Em 1950, foi sugerido pelos autores Bacon e Edelman e, também, Blanchard e Albon que a reação de hidrólise da molécula de sacarose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* ocorria em duas etapas. Na primeira, havia a hidrólise da sacarose em glucose e a frutose formava uma

complexo ativado com a enzima β -frutofuranosidase responsável pela reação. Em seguida, ocorre a transferência da frutose à outra molécula de sacarose formando fruto-oligossacarídeos, contendo de três a quatro unidades de açúcares. Estes fruto-oligossacarídeos são, enfim, hidrolisados em glucose e frutose. Esta descoberta ocorreu porque durante as análises das reações enzimáticas havia uma concentração menor de frutose em relação a glucose encontrada no meio reacional (ANDERSEN; THIESEN; BROE, 1969).

As enzimas β -frutofuranosidasas são glucosidasas constituídas por glicoproteínas com cerca de 20% a 50% de carboidratos em sua composição e podem se apresentar em um ou mais monômeros, de acordo com a origem. A atividade de transfrutossilacção desta enzima depende das condições reacionais como a concentração de sacarose maior que 200 g.L^{-1} , a temperatura e o valor de pH. A atividade de transfrutossilacção também é variável entre enzimas provenientes de diferentes micro-organismos (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

A enzima β -frutofuranosidase foi empregada por Michaelis-Menten para o estudo da cinética da hidrólise da sacarose e foi verificado que quando empregada em concentrações de sacarose acima de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ($68,46 \text{ g.L}^{-1}$) a enzima desvia da cinética clássica de ordem zero e apresentava uma diminuição da atividade hidrolítica gradativamente. Autores acreditam que este fenômeno aconteça devido à diminuição da concentração da água que seria o receptor para os radicais formados na hidrólise da sacarose, à inibição pelo substrato e à agregação do substrato, mas não é dependente da viscosidade do meio de reação (COMBES; MONSAN; MATHLOUTHI, 1981; STRAATHOF; KIEBOOM; BEKKUM, 1986). Segundo Straathof *et al.* (1986) um fato negligenciado nestes estudos foi a capacidade de transfrutossilacção desta enzima. Acima da concentração de $0,29 \text{ mol.L}^{-1}$ (100 g.L^{-1}) a formação de oligossacarídeos pela transferência de um grupamento β -fructofuranosil à álcoois primários formando oligossacarídeos já não pode ser negligenciada. Os álcoois primários competem com a água para a recepção destes radicais, podendo assim, em uma reação de hidrólise, ser transferido para o grupamento hidroxil do carbono 6 e do carbono 1 da frutose, bem como do carbono 6 da glucose (STRAATHOF; KIEBOOM; BEKKUM, 1986).

A reação realizada por esta enzima é conhecida como hidrólise reversa que consiste em uma reação em duas etapas. Na primeira etapa é verificada a formação de um complexo ativado entre a enzima e o grupamento frutossil gerado pela

hidrólise do sacarídeo. Em seguida, ocorre a transferência do grupamento frutossil a um aceptor que pode ser a sacarose, formando os trissacarídeos, ou outras moléculas de fruto-oligossacarídeos (figura 2). Acredita-se que o aumento da concentração do substrato, com a conseqüente diminuição da atividade de água, pode aumentar a produção de fruto-oligossacarídeos, já que a produção depende das constantes de equilíbrio entre as etapas da reação (MONSAN; PAUL, 1995; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

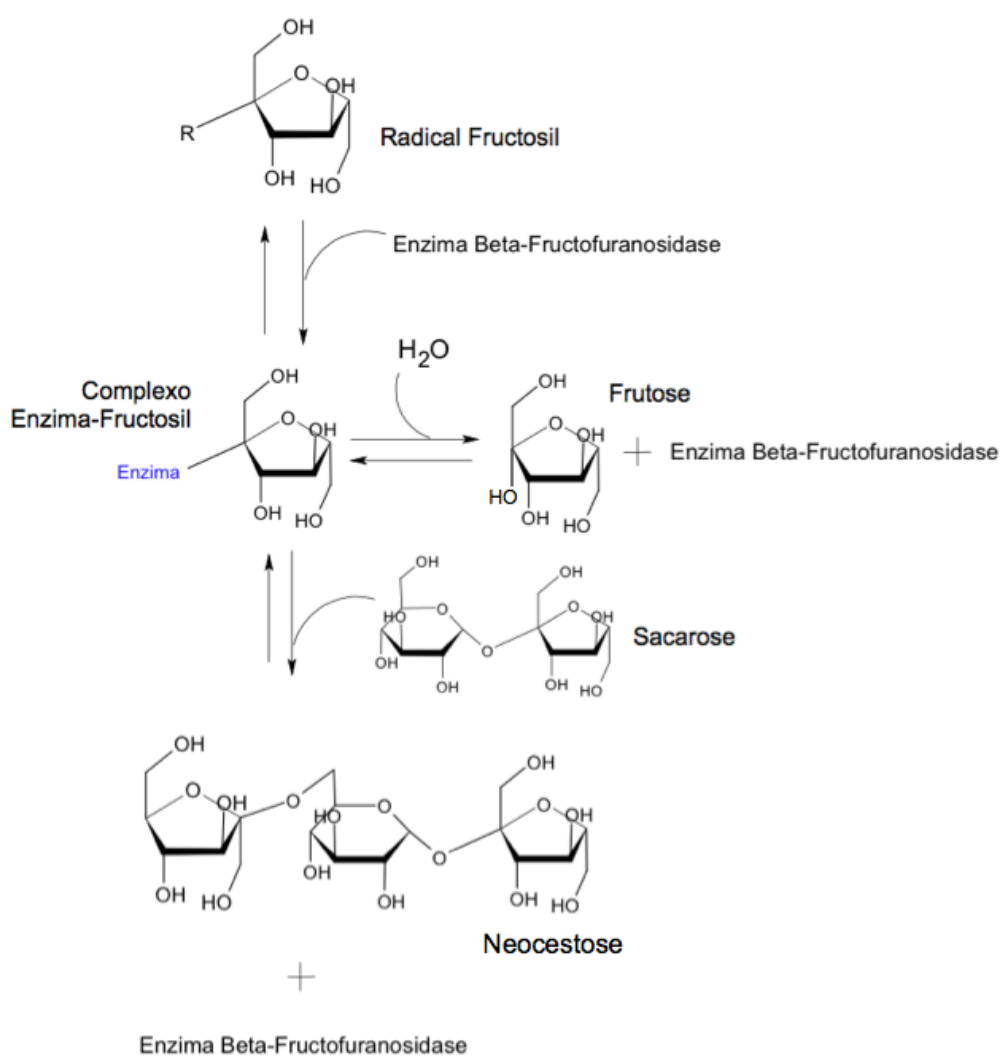


FIGURA 2 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE REVERSA CATALISADA PELA ENZIMA β -FRUCTOFURANOSIDASE

FONTE: adaptado de Antosová; Polakovic (2001)

A enzima β -fructofuranosidase também é capaz de realizar a reação de transglucosilação. Esta reação também é realizada em duas etapas. A primeira etapa da reação consiste na ativação do doador pela enzima. Por sua vez, a segunda é a transferência do radical a um aceitador adequado, que pode ser a sacarose ou um fruto-oligossacarídeo (FIGURA 3). Esta reação é um processo cinético controlado, já que o produto (fruto-oligossacarídeo) formado pode ser o substrato para a reação enzimática. Desta forma, verificou-se que a concentração dos produtos formados depende da velocidade de transfrutossilação e hidrólise da enzima (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001). Straathof *et al.* (1986) verificaram uma maior formação de produtos no início do tempo de reação, atingindo a seguir um platô, seguido pela diminuição da concentração dos fruto-oligossacarídeos causado pela hidrólise dos produtos formados e pela menor síntese dos produtos.

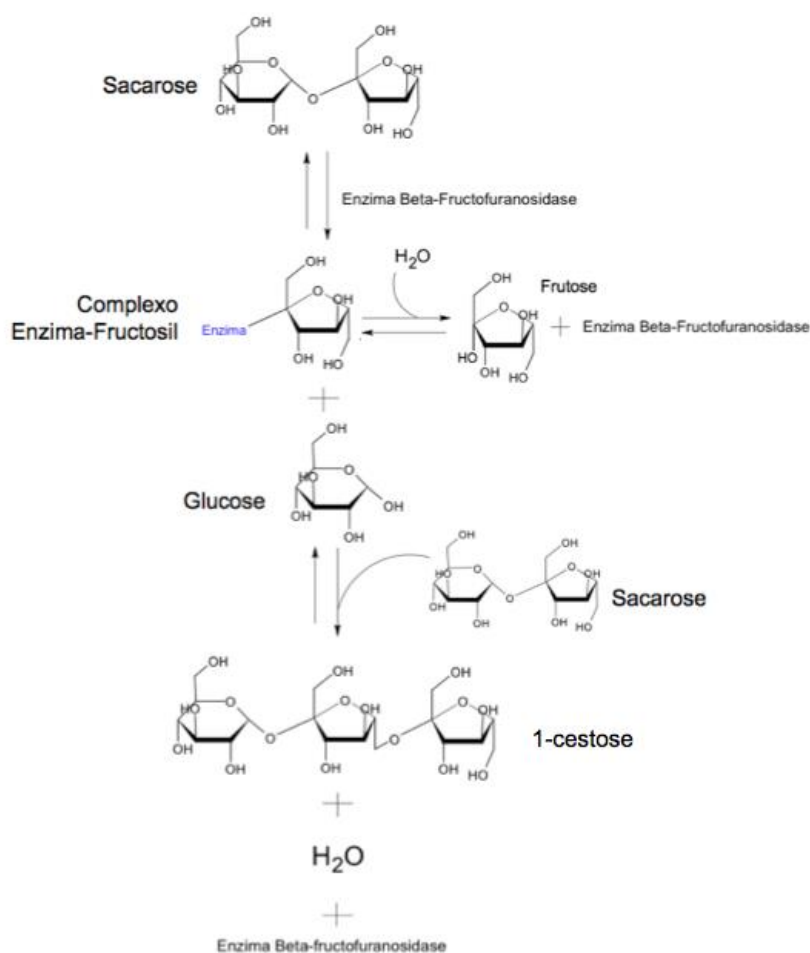


FIGURA 3 - REAÇÃO DE TRANSGLUCOSILAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA β -FRUTOFURANOSIDASE

FONTE: adaptado de Antosová; Polakovic (2001)

A outra enzima capaz de formar fruto-oligossacarídeos, a frutossiltransferase, é uma glucossiltransferase que catalisa a transferência de um monossacarídeo (frutose) de um doador a um sacarídeo aceitor, apresentando pouca afinidade pela água como aceitor (FIGURA 4), ou seja, apresenta baixa atividade de hidrólise. Esta reação apresenta regioespecificidade e estereoespecificidade, com retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico (PALCIC, 1999; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001)

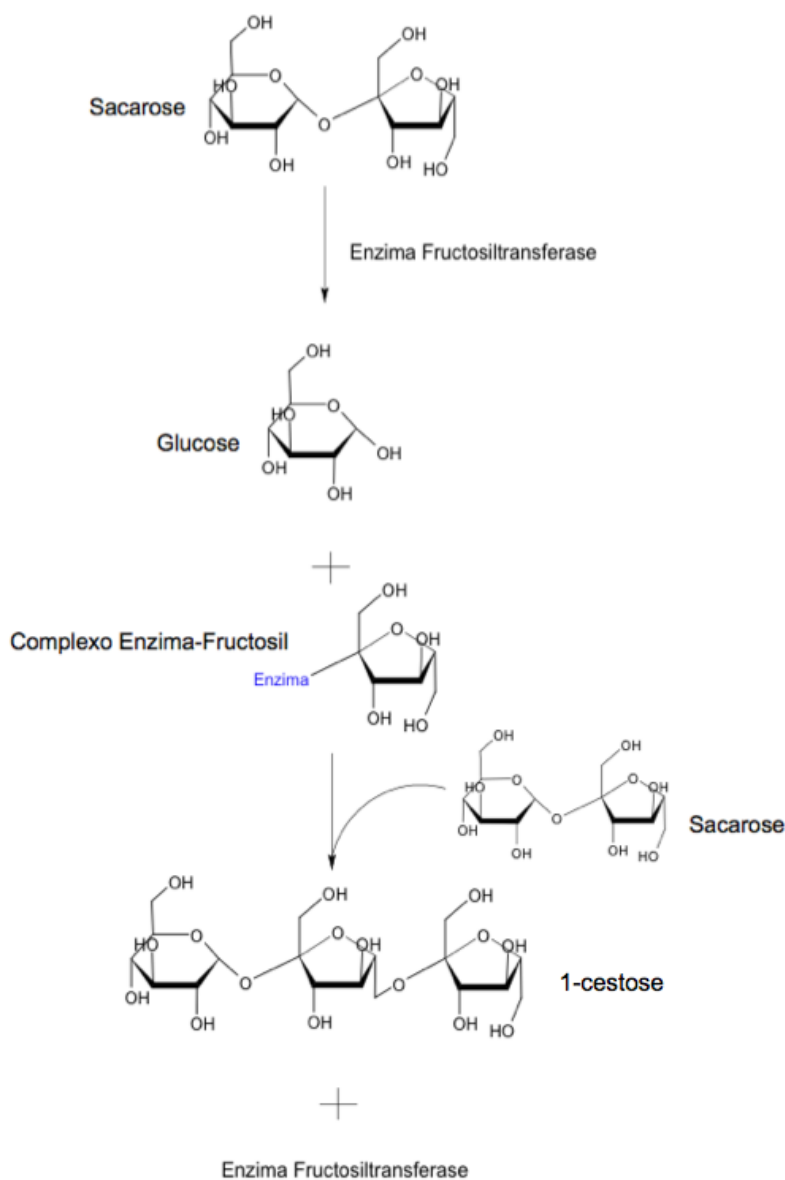


FIGURA 4 - TRANSFERÊNCIA DA FRUTOSE CATALISADA PELA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE

Fonte: adaptado de Antosová; Polakovic (2001)

A enzima frutossiltransferase, diferentemente da enzima β -frutofuranosidase, apresenta alta taxa de produção de fruto-oligossacarídeos mesmo em concentrações abaixo de 200 g.L^{-1} de sacarose (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

As enzimas β -frutofuranosidase e/ou frutossiltransferase podem ser inibidas competitivamente ou não competitivamente pela frutose, glucose e cátions metálicos. Ambas inibições são reversíveis. A inibição competitiva é definida como a competição realizada por uma substância com características estruturais semelhantes ao substrato pelo sítio ativo da enzima, ela pode ser revertida aumentando-se a concentração do substrato ao meio reacional. Por sua vez, na inibição não competitiva, ocorre a ligação de uma substância à um sítio distinto ao sítio ativo da reação no complexo formado entre a enzima e o substrato durante a reação enzimática, diminuindo a velocidade máxima da reação enzimática. Algumas substâncias podem atuar como inibidores competitivos e não competitivos, sendo chamados de mistos (NELSON; COX, 2011). Cátions metálicos como cobre, mercúrio, chumbo, prata, zinco e ferro são inibidores não competitivos das reações de transfrutoseilação (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001). Por sua vez, a frutose é um inibidor competitivo e a glucose é descrita como um inibidor parcial, não competitiva (COMBES; MONSAN, 1983; FARINE *et al.*, 2001). Outros autores descrevem o comportamento da glucose como inibidora competitiva, pela formação de produto de reação diferente da formação dos fruto-oligossacarídeos (JUNG *et al.*, 1989; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001)

3.3 OBTENÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos podem ser empregados nas reações de formação dos fruto-oligossacarídeos como células inteiras, imobilizadas ou não, ou suas enzimas, purificadas ou no extrato celular (NISHIZAWA; NAKAJIMA; NABETANI, 2001).

Dentre os micro-organismos empregados para a obtenção de fruto-oligossacarídeos estão os fungos filamentosos das espécies *Aspergillus niger* (OKU; TOKUNAGA; HOSOYA, 1984), *Aspergillus oryzae* (OTTONI *et al.*, 2012) e *Aspergillus japonicus* (YANG *et al.*, 2008), além de *Aureobasidium pullulans*

(DOMINGUEZ et al., 2012) e *Penicillium citrinum* (LIM et al., 2005; PARK et al., 2005; LIM et al., 2007).

O fungo filamentoso *Aspergillus niger*, por meio do isolamento de sua enzima β -frutofuranosidase, tem sido empregado desde a década de 80 para a obtenção industrial de fruto-oligossacarídeos pela indústria Meiji Seika Kaisha Ltda. (SINGH; SINGH, 2010). O produto produzido é constituído por uma mistura de 1-cestose, nistose (tetrassacarídeo) e 1^o- β -furanosil nistose (pentassacarídeo) e inicialmente foi empregado como adoçante (OKU; TOKUNAGA; HOSOYA, 1984).

A otimização do meio de crescimento do micro-organismo, do meio de reação, do emprego de células íntegras, imobilizadas ou não, da utilização de enzimas purificadas, imobilizadas ou não, da concentração de sacarose do meio reacional, do valor de pH, da temperatura e do tempo de reação parecem influenciar na concentração de fruto-oligossacarídeos a ser formada e quais carboidratos a serem produzidos.

Em 2005, Park et al. realizaram a produção contínua de fruto-oligossacarídeos em reator contendo 10 g de células imobilizadas do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* KCCM 11663, solução de sacarose 600 g.L⁻¹, pH 6,0, em fluxo de 1,3 mL.min⁻¹, temperatura de 50 °C. Neste estudo os autores constataram a formação de 49 g.L⁻¹ após 3 dias de reação, e que após 40 dias de reação contínua, a produção era mantida em 40 g.L⁻¹ de fruto-oligossacarídeos (PARK et al., 2005).

Dhake e Patil (2007) testaram as fontes de carbono glucose, frutose, maltose e sacarose na concentração de 10 g.L⁻¹ para a produção da enzima frutossiltransferase extracelular e intracelular durante o crescimento do micro-organismo *Penicillium purpurogenum* isolado de solo. Os autores verificaram que o emprego de sacarose induzia a produção da enzima frutossiltransferase intracelular e extracelular deste fungo filamentoso e que a adição de vitaminas a um meio de cultura constituído de cloreto de sódio, fosfato básico de potássio, nitrato de sódio e sacarose não implicou em aumento da produção destas enzimas (DHAKA; PATIL, 2007).

Fernandez et al. (2007) realizaram a seleção de fungos filamentosos para a produção de fruto-oligossacarídeos e, dentre os 17 micro-organismos testados, verificaram a influência da temperatura e do valor de pH na taxa de formação de fruto-oligossacarídeos e de hidrólise realizada pelas enzimas presentes nestes

micro-organismos. O efeito da temperatura e do pH foi verificado por meio de um experimento fatorial 2^2 , utilizando as temperaturas de 40 °C e 50 °C e valores de pH 5,5 e 8,0, empregando como substrato solução de sacarose 640 g.L^{-1} em tampão tris-acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Os autores constataram que os efeitos do pH e temperatura eram distintos para cada fungo filamentosos, podendo ter efeitos positivos ou negativos para a atividade de transfrutossilacção e de hidrólise (FERNANDEZ *et al.*, 2007).

Em 2012, Ottoni *et al.* realizaram um estudo para selecionar as fontes de carbono e nitrogênio a serem empregadas no crescimento do fungo filamentosos *Aspergillus oryzae* IPT301 com o intuito de determinar a atividade da enzima frutossiltransferase. Após o crescimento do fungo filamentosos, no meio de cultivo contendo uma fonte de carbono e de nitrogênio, o micélio e o sobrenadante, separadamente, foram empregados para a determinação da atividade de transfrutossilacção. Os autores conseguiram a maior atividade de transfrutossilacção com as fontes sacarose e ureia e constataram que não houve diferenças entre o emprego do micélio ou sobrenadante (OTTONI *et al.*, 2012).

Ganaie, Dehariya e Gupta (2013) verificaram que o valor de pH, a velocidade de agitação, a fonte de carbono e de nitrogênio utilizadas para o crescimento do micro-organismo *Aspergillus flavus* (NFCCI 2364), influenciaram na produção e na atividade de transfrutossilacção e de hidrólise da enzima frutossiltransferase. Para estes autores, um meio constituído de sacarose e peptona em valor de pH 6,0, mantido sob velocidade de rotação de 200 rpm pode aumentar a eficiência na obtenção de fruto-oligossacarídeos pela frutossiltransferase deste micro-organismo (GANAIE; DEHARYA; GUPTA, 2013).

Pesquisadores relataram a formação consecutiva de cestose, nistose e outros fruto-oligossacarídeos, com conseqüente diminuição na concentração dos fruto-oligossacarídeos precursores em função do tempo, em experimentos com a enzima β -frutofuranosidase extracelular do fungo filamentosos *Aspergillus japonicus* em solução de sacarose 500 g.L^{-1} , pH 5,5 mantido em tampão acetato $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$, incubado a 55 °C por 20 horas (YANG *et al.*, 2008). Nesta pesquisa também verificaram a influência da adição de células de levedura (*Pichia pastoris*) ao meio reacional contendo a enzima extracelular do fungo filamentosos *Aspergillus japonicus*. A utilização das células de leveduras auxiliaram no consumo de glucose residual no meio e isto favoreceu a transformação do restante de monossacarídeos e sacarose

em fruto-oligossacarídeos, resultando desta forma no aumento da produção de 56,55% (p/v) de fruto-oligossacarídeos para 84,45% (p/v).

Além dos fungos filamentosos, também tem sido buscado novas alternativas para a obtenção dos fruto-oligossacarídeos, como bactérias, dentre elas *Bacillus amyloliquefaciens* (TIAN; KARBOUNE, 2012) e *Bacillus macerans* (PARK; OH; YUN, 2001), e leveduras isoladas da natureza (MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007) leveduras das espécies *Rhodotorula daiarensis* (GUTIÉRREZ-ALONSO *et al.*, 2009), *Schwanniomyces occidentalis* (ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2007) e *Xanthophyllomyces dendrorhous* (LINDE *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

Segundo Tian e Karboune (2012), a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* apresenta enzima que desvia do comportamento de Michaelis-Menten tradicional, apresentando dois subsítios de ligação não cooperativos. A atividade de transfrutossilação é ótima na concentração de 600 g.L⁻¹ de sacarose e os principais produtos obtidos são 6-cestose e 1-cestose. A bactéria *Bacillus macerans*, por sua vez, produz enzima com atividade ótima nas condições de temperatura de 50 °C e valor de pH de 5,0. A enzima produzida por esta bactéria produz oligossacarídeos com até seis unidades frutossil ligadas à sacarose. Além disso, os autores afirmam que diferentemente do restante das enzimas atualmente conhecidas com atividade de transfrutossilação, esta enzima apresenta apenas 66 KDa de massa molecular (PARK; OH; YUN, 2001).

Gutierrez-Alonso *et al.* (2009) caracterizaram bioquimicamente a enzima β -frutofuranosidase de *Rhodotorula daiarenses* com atividade de transfrutossilação. A atividade de transfrutossilação foi realizada pela adição de uma solução contendo a enzima isolada e purificada com atividade final de 0,5 U.mL⁻¹ em uma solução de sacarose 515 g.L⁻¹, em tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6, 40 °C e agitação de 150 rpm. A enzima apresentou maior produção de fruto-oligossacarídeos após 71 horas de reação, com concentração máxima de 87,9 g.L⁻¹ dos fruto-oligossacarídeos 6-cestose, neocestose, 1-cestose e tetrassacarídeos (GUTIÉRREZ-ALONSO *et al.*, 2009).

Alvaro-Benito *et al.* (2007) realizaram estudo sobre a atividade de transfrutossilação da levedura *Schwanniomyces occidentalis*, para esta levedura a proteína expressa em maior quantidade é a enzima β -frutofuranosidase a qual apresenta valor de pH ótimo para a atividade de 5,5 e temperatura entre 45 a 55 °C. Por meio do emprego do precipitado de proteínas desta levedura e solução de

sacarose 600 g.L^{-1} em tampão acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 5,6) verificou-se a formação de aproximadamente 100 g.L^{-1} de fruto-oligossacarídeos em 20 horas de reação. Por meio da caracterização estrutural dos fruto-oligossacarídeos produzidos, percebeu-se que para a enzima β -frutofuranosidase desta levedura, há a formação de 6-cestose e 1-cestose na proporção 3:1, diferentemente do que ocorre nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em que foi verificado 1-cestose como produto majoritário (ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2007).

A fim de elucidar o funcionamento da enzima, Álvaro-Benito *et al.* (2010) realizaram investigações sobre a composição dos aminoácidos pertencentes à enzima β -frutofuranosidase. Estes autores realizaram mutações no códon para a transcrição da serina (Seu196) para que este fosse substituído por leucina nas enzimas β -frutofuranosidase das leveduras *Schwanniomyces occidentalis* e *Saccharomyces cerevisiae* (utilizada como padrão). Para a surpresa dos pesquisadores, esta modificação gerou um aumento de 3 vezes na atividade de transfrutossilação de ambas enzimas. Acredita-se que esta modificação possa ter causado um rearranjo estrutural, o qual possa ter efeitos deletérios para a atividade de hidrólise destas enzimas (ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2010).

Em 2009, Linde *et al.* descreveram a presença de uma enzima β -frutofuranosidase extracelular produzida pelas cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC MYA-131; ATCC 24202 e ATCC 24230. Esta enzima apresenta-se em 60% na forma glicosilada e dimérica com massa molecular de 160 kDa, enquanto o restante dos monômeros isolados apresentam massa molecular de 60 kDa e não apresenta glicosilação. A caracterização desta enzima foi realizada e demonstrado que a enzima apresenta atividade ótima quando submetida a valores de pH de 5,0 a 6,5 e em temperaturas entre $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Utilizando 2 mL de uma solução de sacarose 410 g.L^{-1} contendo tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 5,6, e solução de enzima suficiente para a obtenção de atividade $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$, obteve-se após 48 horas de incubação a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, em agitação de 200 rpm, 132 g de frutose, 179 g de glucose, 49 g de sacarose, 40 g de neocestose, 18 g de 1-cestose e 8 g de tetrassacarídeos. Percebeu-se que a transfrutossilação realizada pela enzima isolada de *Xanthophyllomyces dendrorhous* produz majoritariamente neocestose, mas também 1-cestose e tetrassacarídeos (LINDE *et al.*, 2009).

Os micro-organismos presentes em flores e frutos estão expostos a diferentes situações de estresse como a disponibilidade de nutrientes, diferentes

temperaturas, valores de pH, radiação solar, disponibilidade de oxigênio e, em especial, atividades osmóticas; e modificam suas atividades bioquímicas para que haja a adaptação ao meio (HOHMANN, 2002).

Em 2007, Maugeri e Hernalsteens realizaram o isolamento de leveduras de flores e frutos das florestas Amazônica e Atlântica e do cerrado capazes de produzir enzimas com alta atividade de transfrutossilação a partir da sacarose. Inicialmente, 495 leveduras isoladas foram testadas em uma reação utilizando solução de sacarose 60 g.L^{-1} , pH 5,0, $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Destas 130 leveduras produziram enzimas extracelulares com atividade de transfrutossilação. Os autores, aleatoriamente, selecionaram somente 4 leveduras identificadas como dos gêneros: *Candida sp.* (uma), *Rhodotorula sp.* (duas) e *Cryptococcus sp.* (uma). As enzimas produzidas por estas leveduras foram recuperadas do sobrenadante e concentradas; então, foram quantificadas a atividade de hidrólise e a atividade de transfrutossilação em soluções de sacarose com concentrações de 20 g.L^{-1} e 500 g.L^{-1} , pH 5,0 e temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Após as análises obtiveram o melhor resultado com uma das cepas isoladas de *Rhodotorula sp.* a qual converteu cerca de 50% da sacarose em fruto-oligossacarídeos. A atividade de síntese de fruto-oligossacarídeos em relação à hidrólise é de 7,7 para a enzima de *Rhodotorula sp.* LEB-V10, levedura com a maior produção de fruto-oligossacarídeos (MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007).

Dentre os micro-organismos citados, as leveduras apresentam maior potencial para a produção de neofruto-oligossacarídeos. Acredita-se que devido à estrutura ramificada destes, eles apresentem maior poder bifidogênico, ou seja, maior poder de estimular seletivamente o crescimento de bifidobactérias benéficas ao trato gastrointestinal, e maior resistência às altas temperaturas e variações de pH quando comparados aos oligossacarídeos semelhantes à inulina; assim, sendo produtos mais interessantes à comercialização (MARX; WINKLER; HARTMEIER, 2000; LINDE *et al.*, 2009). Além disso, poucos estudos foram realizados com leveduras para a obtenção de fruto-oligossacarídeos, o que torna interessante a busca de leveduras com capacidade de produzir fruto-oligossacarídeos a partir de moléculas de sacarose (NISHIZAWA; NAKAJIMA; NABETANI, 2001; MAUGERI; HERNALSTEENS, 2007).

3.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE LEVEDURAS

As técnicas de identificação taxonômica tradicionais são baseadas na classificação do micro-organismo por suas características morfológicas macroscópicas e microscópicas, colorações diferenciais e testes bioquímicos para realizar por meio de comparação, a diferenciação e a classificação dos micro-organismos. No entanto, a literatura para a comparação dos resultados dos testes tradicionais é limitada às espécies mais comuns e patogênicas. Além disso, estes testes são demorados e podem resultar em identificações incorretas, em especial para leveduras. A fim de diminuir os inconvenientes das metodologias tradicionais, técnicas moleculares tem sido empregadas como alternativas para a identificação dos micro-organismos (ÁLVAREZ-MARTÍN *et al.*, 2007; CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2010; BERNARDI; SILVA; VALENTE, 2011).

A espectrometria de massa MALDI-TOF é uma técnica consagrada para ser utilizada na identificação taxonômica, inicialmente para bactérias e, posteriormente, para leveduras e fungos filamentosos (HOLLAND *et al.*, 1996; DEMIREV *et al.*, 1999; MARKLEIN *et al.*, 2009; HENDRICKX *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2011). Na técnica empregando espectrometria de massa MALDI-TOF é gerado um espectro de massa que equivale a um perfil molecular característico para cada gênero e espécie, devido à detecção pelo equipamento de proteínas e peptídeos de forte caráter básico e média hidrofobicidade, além de outros metabólitos secundários que se apresentam com alta abundância no citosol, como lipídeos (RYZHOV; FENSELAU, 2001; CLAYDON *et al.*, 1996; ERHARD; VON DOHREN; JUNGBLUT, 1997; HATHOUT *et al.*, 2000). Podem ser detectadas concentrações menores que 10^4 células.mL⁻¹ (DEMIREV; FENSELAU, 2008). Para leveduras, é necessária uma preparação prévia da amostra que consiste em uma extração proteica visto que a parede celular da levedura impede a obtenção de espectros de massa de qualidade, ou seja, com grande número de íons e melhor relação sinal:ruído (QIAN *et al.*, 2008; MARKLEIN *et al.*, 2009).

Além da espectrometria de massa MALDI-TOF, outras técnicas de biologia molecular também são bastante utilizadas para a identificação taxonômica de leveduras, como o PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase seguida da identificação do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, do inglês

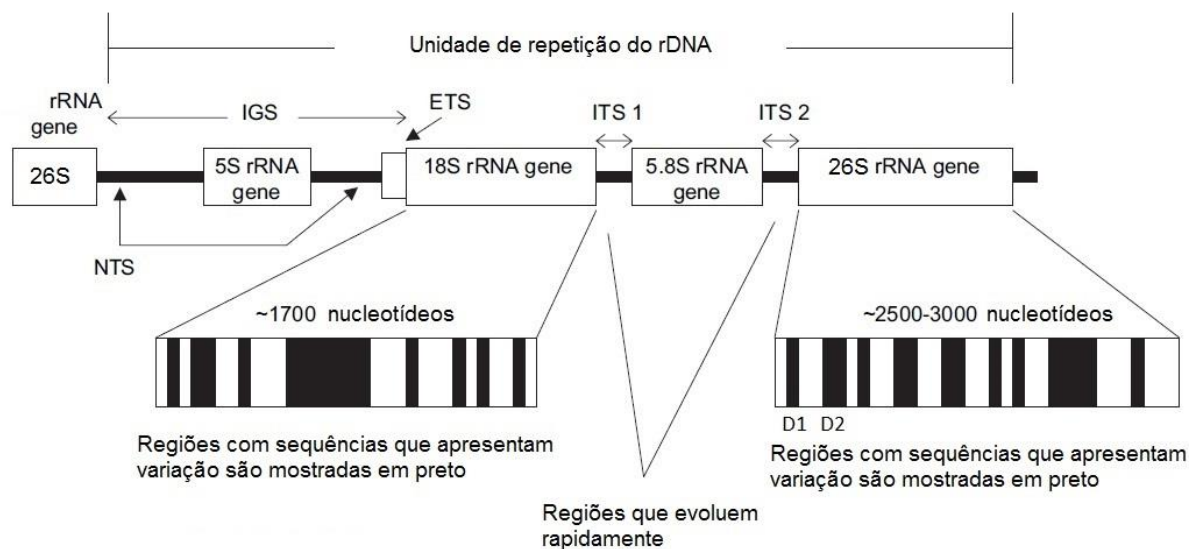
Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta reação é realizada em duas etapas. Primeiramente, é realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na replicação enzimática de uma sequência-alvo de DNA *in vitro* por meio do emprego de iniciadores específicos.

Muitas das sequências alvos para confecção de iniciadores utilizam o DNA ribossomal (rDNA), que codifica para o RNA ribossomal (rRNA). Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o rDNA é composto por 150 a 200 cópias *in tandem*, localizadas no cromossomo XII. Cada uma das cópias é constituída de quatro genes de RNA ribossomal (figura 5): a subunidade maior (LSU ou 26S rRNA), a subunidade menor (SSU ou 18S rRNA) e os genes 5S e 5.8S. Além disso, contém dois espaçadores transcritos internos (Internal Transcribed Spacers, ITS1 e ITS2) e dois externos (External Transcribed Spacers, ETS1 e ETS2), flanqueados por regiões não transcritas (Non-transcribed Spacers, NTS), as quais também são conhecidas por espaçadores intergênicos (IGS) (VENEMA; TOLLERVEY, 1999; JAMES *et al.*, 2009).

As regiões espaçadoras internas são as menos conservadas, apresentando alta variabilidade inter e intraespecífica, resultando em uma maior quantidade de genes diferentes entre gêneros e espécies de micro-organismos. Assim, oligonucleotídeos iniciadores são elaborados usando sequências das regiões conservadas de forma que os produtos de amplificação venham a abranger as regiões variáveis (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999; MITCHELL; ZUCCARO, 2006).

A segunda etapa da reação de PCR-RFLP, por sua vez, consiste na clivagem dos produtos de PCR por enzimas de restrição que cortam sequências palindrômicas específicas. Em seguida, os fragmentos resultantes são separados por eletroforese em gel e o perfil de fragmentação é comparado ao perfil de espécies conhecidas para a identificação taxonômica do micro-organismo (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

Por meio do emprego das técnicas de espectrometria de massa MALDI-TOF e de PCR-RFLP, as leveduras ambientais avaliadas neste trabalho para a formação de fruto-oligossacarídeos tiveram seu gênero e espécie identificados.



Esta região compreende quatro genes principais (5S, 5.8S, 18S e 26S) intercalados entre os quais estão regiões espaçadoras (NTS – espaçador não transcrito; ETS – espaçador transcrito externo; ITS – espaçador transcrito interno).

FIGURA 5 - UNIDADE DE REPETIÇÃO DO DNA RIBOSSÔMICO

Fonte: Mitchell e Zuccaro (2006)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram empregadas 141 leveduras isoladas da fermentação espontânea de mosto de uvas colhidas no Estado do Paraná, no ano de 2013 (GAENSLY, 20XX), após autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético número 010198/2013/0. Denominados numericamente de 2; 7; 10; 11; 12; 14; 16; 17; 18; 20; 21; 22; 23; 24; 26; 27; 28; 30; 31; 32; 34; 35; 36; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 47; 48; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 69; 70; 71; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 83; 84; 85; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 97; 99; 100; 104; 106; 108; 110; 112; 118; 122; 124; 130; 131; 134; 136; 139; 141; 142; 144; 145; 146; 149; 150; 154; 157; 158; 164; 165; 167; 168; 170; 180; 186; 191; 192; 205; 208; 213; 218; 222; 223; 225; 228; 229; 230; 233; 244; 245; 247; 252; 258; 262; 263; 266; 271; 272; 276; 277; 278; 280; 283; 286; 287; 288; 291; 292; 294.

4.2 ATIVAÇÃO

Cada levedura isolada foi ativada pela transferência do conteúdo de um tubo de polipropileno de 1,5 mL de capacidade contendo células de leveduras conservadas por congelamento (Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Universidade Federal do Paraná) para frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, contendo 10 mL de meio líquido YEPD (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹, glicose 20 g.L⁻¹), com valor de pH ajustado para 5,5 ± 0,2 medido em aparelho marca WTW, modelo 330i. Todos os meios foram esterilizados em autoclave vertical, marca Phoenix por calor úmido, a temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm, 15 minutos.

Após a inoculação, os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em agitador incubador Marconi, modelo MA 420, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28°C, durante 24 horas.

4.3 CONSERVAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Após a ativação, para cada levedura, 5 mL do cultivo crescido foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio YEPD, pH 5,5, e, em seguida, mantido em agitador incubador sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28 °C.

Depois de 24 horas de crescimento das células, foi verificada a ausência de outros micro-organismos contaminantes, pela técnica à fresco em microscópio óptico marca Olympus (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012a). Logo após a constatação de que o cultivo estava puro, a conservação celular foi realizada em fluxo laminar Labconco Purifier Class II pela distribuição do cultivo em tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, estéril, com tampa. Estes tubos contendo o cultivo foram centrifugados em centrífuga SIGMA 1-14, por 295 xg, 5 minutos e o sobrenadante descartado para a obtenção das células. A cada tubo de polipropileno contendo as células foram adicionados 800 µL de meio YEPD, valor de pH 5,5, e 200 µL de glicerol como agente crioprotetor. Os tubos contendo as células suspensas foram mantidos em freezer Consul, temperatura de -18 °C.

4.4 CRESCIMENTO CELULAR

A frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio líquido YEPD, foram adicionados 10 mL de cultivo celular crescido por 24 horas em agitador incubador Marconi, modelo MA 420, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28 °C. Estes frascos de Erlenmeyer inoculados foram mantidos em agitador incubador marca TECNAL, modelo TE-421, sob as mesmas condições de agitação e temperatura até o final da fase exponencial.

Depois do crescimento das células, 20 mL de cultivo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade contendo 200 mL de meio YEPD, pH 5,5. Os frascos inoculados foram mantidos em agitador incubador nas mesmas condições de agitação, temperatura e tempo. Após o crescimento celular, estes cultivos foram destinados ao preparo da suspensão celular.

Este procedimento foi repetido para cada uma das 141 leveduras a fim de se preparar 141 suspensões celulares destinadas aos experimentos.

4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS

A separação das células do cultivo obtido, como descrito no item 4.4, se deu por meio da centrifugação do cultivo de cada levedura em tubos de Falcon de 50 mL de capacidade, a 7000 xg , por 5 minutos, em centrífuga SIGMA, modelo 3-16P. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram suspensas com água destilada estéril e novamente centrifugadas a 7000 xg , por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células das leveduras suspensas em água destilada estéril. A suspensão foi mantida em geladeira, a 4 °C, até o momento do uso.

Cada suspensão foi quantificada pelo método gravimétrico (HISS, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012b).

4.6 SELEÇÃO DE LEVEDURAS AMBIENTAIS PRODUTORAS DE ENZIMAS COM ATIVIDADE HIDROLÍTICA E DE TRANSFRUTOSILAÇÃO

A seleção de leveduras ambientais produtoras de enzimas com atividade de hidrólise e de transfrutosilação foi realizada por meio da inoculação de um volume de suspensão de células que continha 28 mg de células secas por mililitro de meio reacional constituído de solução de sacarose 500 $g.L^{-1}$, valor de pH inicial de $4,5 \pm 0,2$, em frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade. Estes frascos de Erlenmeyer com meio reacional inoculado foram mantidos em agitador incubador Tecnal TE-421 por 12 horas nas condições de temperatura de 50 °C e agitação de 150 rpm.

Amostras foram retiradas a cada 3 horas. O conteúdo dos frascos de Erlenmeyer foi vertido para tubos de Falcon de 15 mL de capacidade e mantidos a 90 °C, por 10 minutos, para a inativação das enzimas. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e 1 mL foi transferido, com auxílio de micropipeta, para tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, com tampa. Estes tubos, então, foram centrifugados a 7000 xg , 5 minutos, para a separação do sobrenadante das células. O sobrenadante foi empregado para investigação da formação dos produtos de

reação (oligossacarídeos e monossacarídeos – glucose e frutose) e da concentração de sacarose remanescente por meio dos métodos analíticos de cromatografia em camada delgada e cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

4.7 DETERMINAÇÃO DOS PARAMETROS pH E TEMPERATURA PARA AS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DAS ENZIMAS DAS LEVEDURAS SELECIONADAS

Para todos os experimentos, um volume de suspensão de cada levedura foi inoculada na concentração de 28 mg de células secas por mililitro de meio reacional, em 10 mL de meio reacional contidos em frascos de Erlenmeyer de 50 mL. Para cada levedura, três meios reacionais foram utilizados constituídos por: 500 g.L⁻¹ de sacarose em tampão acetato 100 mM, pH 4,5; 500 g.L⁻¹ de sacarose em tampão acetato 100 mM, pH 5,5; e, 500 g.L⁻¹ de sacarose em tampão fosfato 100 mM, pH 6,5. Para cada meio reacional foram empregadas as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C. Todos os experimentos para determinação dos valores de pH e temperatura foram conduzidos em agitador incubador Marconi, MA 420, sob agitação de 150 rpm.

Em todos os experimentos realizados, a reação foi interrompida após 6 horas, pela transferência do conteúdo dos frascos de Erlenmeyer para tubos de Falcon de 15 mL de capacidade aquecidos a 90 °C, por 10 minutos. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e 1 mL foi transferido, com auxílio de micropipeta, para tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, com tampa. Estes tubos contendo a reação inativada foram centrifugados a 7000 xg por 5 minutos, para a separação do sobrenadante das células. O sobrenadante foi empregado para a quantificação dos produtos de reação por cromatografia em fase líquida de alta eficiência.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular das suspensões foi realizada pelo método gravimétrico, técnica do peso seco (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012b). Em tubos de polipropileno de 5 mL de capacidade previamente secos até valor de peso constante conhecido, foram transferidos 0,10 mL da suspensão e os tubos foram congelados a -18 °C. Após o congelamento, as células foram secas por liofilização em liofilizador de bancada marca Lodan até peso constante. Os tubos de polipropileno foram pesados em balança analítica marca Bioprecisa, modelo FA 2104N.

A concentração de células secas em mg.mL^{-1} foi determinada (FIGURA 6) (HISS, 2001).

$$X(s) = \frac{X}{V}$$

Onde:

$X(s)$ = Concentração em miligrama de célula seca por mililitro de suspensão

X = Peso de célula seca (mg)

V = volume de suspensão (mL)

FIGURA 6 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO PARA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULA SECA (mg.mL^{-1}) DA SUSPENSÃO

FONTE: Hiss (2001)

4.8.2 Verificação da formação de oligossacarídeos por cromatografia em camada delgada

O sobrenadante da reação para a seleção de leveduras produtoras de enzimas com atividade hidrolítica e de transfrutossilacção (item 4.6) foi empregado para a avaliação da formação de oligossacarídeos empregando a técnica de cromatografia em camada delgada. Esta técnica foi realizada utilizando placas de vidro de 20 x 20 cm, contendo a fase estacionária sílica gel 60, 300 µm de espessura. Para esta técnica foram testadas três fases móveis e três reveladores, de acordo com o QUADRO 1.

QUADRO 1 - FASES MÓVEIS E SOLUÇÕES REVELADORES AVALIADAS PARA A ANÁLISE QUALITATIVA POR TÉCNICA DE CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA

Fases Móveis	Solução Reveladora	Autores
Acetona: Água (90:10)	Spray de solução de uréia (3 g de uréia, 100 mL de ácido fosfórico em butanol e 5 mL de etanol)	(TOLEDO <i>et al.</i> , 2004)
Acetonitrila: Água (82:18)	Spray de solução de difenilamina-anilina-fosfato	(OKU; TOKUNAGA; HOSOYA, 1984)
Butanol: Ácido acético: Água (5:4:1)	Spray de solução contendo 2% de ácido sulfúrico em metanol.	(INTHANAVONG, 2011)

Soluções padrão de glicose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose da marca Sigma Aldrich na concentração de 1 mg.mL⁻¹ foram utilizadas. Em todas as placas foram feitas três aplicações de cada padrão, empregando capilar, utilizando um volume total de 4 µL.

As placas de sílica foram divididas deixando limites de 2 cm em todas as bordas e empregou-se corrida inicial de 4 cm para todas as fases móveis testadas e

de 10 cm para a fase móvel escolhida. O volume de fase móvel foi adequado ao volume da cuba cromatográfica, utilizando-se 120 mL de fase móvel.

As soluções de revelação foram testadas separadamente. Foram aplicadas nas placas cromatográficas com auxílio de borrifador de vidro e ar comprimido. Após a aplicação de cada revelador, as placas de vidro foram mantidas em estufa por 10 minutos a 100 °C para o aparecimento das bandas cromatográficas.

Os valores de fator de retenção foram calculados para cada padrão, figura 7 (KOWALSKA, 2003). Os açúcares das amostras foram identificados comparando-se seus fatores de retenção com aqueles dos padrões utilizados.

$$\text{Fator de retenção (Rf)} = \frac{[\text{distância percorrida pelo analito (cm)}]}{[\text{distância percorrida pela fase móvel (cm)}]}$$

FIGURA 7 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DO FATOR DE RETENÇÃO PARA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

FONTE: Kowalska (2003)

4.8.3 Quantificação de Carboidratos por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência

As amostras que apresentaram fatores de retenção equivalentes aos padrões de fruto-oligossacarídeos na cromatografia em camada delgada foram analisadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Para esta técnica foi utilizado o equipamento marca Varian® Pro Star acoplado ao detector de índice de refração de mesma marca, modelo 350. A avaliação dos cromatogramas obtidos foi realizada por meio do software Workstation Star 6.0.

Para a realização desta metodologia foram testadas três colunas: Varian Microsorb-MV C18, 5 µm de partícula, 250x46 mm; Varian Microsorb-MV C8, 5 µm

de partícula, 250x46 mm; e, Supelcosil LC-NH₂, 5 µm de partícula, 250x46 mm com diferentes fases móveis.

Para a coluna Varian Microsorb-MV C18 de fase reversa, empregou-se a fase móvel acetonitrila: água, nas proporções: 10:90, 20:80 (NASCIMENTO *et al.*, 2003), 50:50, 80:20, 70:30.

Para a coluna Varian Microsorb-MV C8 de fase reversa, foi utilizado 40% de metanol grau HPLC em água ultrapura como fase móvel (CHEN *et al.*, 2004).

Para a coluna Supelcosil LC-NH₂ foram testadas as fases móveis contendo acetonitrila: água, nas proporções: 80:20 (CRUZ *et al.*, 1998), 75:25 (DORTA *et al.*, 2006) e 70:30 (MUSSATTO *et al.*, 2009).

Para todas as colunas cromatográficas, o volume de injeção inicial testado foi de 20 µL e o fluxo inicial foi de 1 mL.min⁻¹.

Foram selecionadas a fase móvel e a coluna cromatográfica para a eluição das amostras de acordo com os tempos de retenção das soluções padrão em água de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, na concentração de 1 mg.mL⁻¹.

Para a quantificação dos carboidratos nas amostras por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, foram utilizados os padrões externos: nistose, 1-cestose, glucose, frutose e sacarose nas concentrações de 0,10 mg.mL⁻¹, 0,50 mg.mL⁻¹, 0,75 mg.mL⁻¹, 1,00 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹, 2,50 mg.mL⁻¹ e 5,00 mg.mL⁻¹. Foram utilizadas também a concentração de 10,00 mg.mL⁻¹ de glucose, frutose e sacarose e ainda a concentração de 20,00 mg.mL⁻¹ de sacarose.

Para cada substância padrão, com resultados em triplicata, foram elaboradas curvas padrão relacionando área dos picos cromatográficos, calculadas pelo software Workstation Star 6.0, com as concentrações empregadas. O coeficiente de determinação (R²) foi calculado para cada curva padrão utilizando o pacote Microsoft Office, software Excel 2011.

O sobrenadante das amostras foi diluído 50 vezes com água ultrapura e filtrado em filtro de porosidade 0,20 µm para a realização da cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Após a obtenção dos cromatogramas, os tempos de retenção dos picos cromatográficos das amostras foram comparados aos tempos de retenção dos picos cromatográficos dos padrões e as concentrações dos analitos calculadas conforme as curvas padrão obtidas.

4.9 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS

4.9.1 Espectrometria de Massa MALDI-TOF

As identificações das leveduras ambientais realizadas foram feitas em parceria com a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – Distrito Federal, de acordo Agustini *et al.* (2014).

Cada uma das leveduras foi, primeiramente, crescida em meio sólido YEPD, pH 5,5, a temperatura de 28 °C, por 48 horas. Após o crescimento, foi verificada a ausência de outros micro-organismos contaminantes, pela técnica à fresco em microscópio óptico marca Olympus (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012a). Depois da verificação da ausência de contaminantes, foram preparadas as suspensões das leveduras empregando-se um *loop* de células equivalente a 10 µL, 300 µL de água ultrapura, estéril, e 900 µL de etanol absoluto em tubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, com tampa, estéril. Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas com auxílio de vórtex.

Estes tubos de polipropileno contendo as suspensões de células foram encaminhados à EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, aonde foram centrifugadas na rotação de 10000 *xg* por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Ao precipitado foram adicionados 30 µL de ácido fórmico a 70% e 30 µL de acetonitrila. O conteúdo dos tubos de polipropileno foi homogeneizado e os tubos novamente centrifugados nas mesmas condições. Em seguida, 1 µL do sobrenadante diluído na proporção de 1:4 em água ultrapura foi transferido para um dos 96 poços da placa-alvo do espectro de massa, ao qual após seco foi adicionado 1 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), constituída por uma solução saturada (10 mg.mL⁻¹) diluída em acetonitrila: água: ácido trifluoroacético 3% na proporção de 50:40:10 (v:v:v).

As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF modelo MicroFlex LRF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), empregando laser de nitrogênio (337 nm), em 20-65% de intensidade. O modo de aquisição do equipamento é espiral. Os espectros foram obtidos em modo positivo, utilizando aceleração de 20 Hz no modo linear. A amplitude de massa para a obtenção do

espectro foi ajustada para 2.000 a 20.000 Da. Para cada espectro foi utilizado 240 disparos de laser, em 6 etapas de 40 disparos cada, empregando posições diferentes de incidência no alvo. Os espectros foram adquiridos no modo de aquisição automático e os picos detectados usando o algoritmo centróide, com as configurações padrão do fabricante (relação sinal/ruído: 2; limite mínimo de intensidade: 600; número máximo de picos: 300).

Os espectros de massa adquiridos foram comparados aos espectros de massa disponíveis no banco de dados do programa MALDI Biotyper (versão 3.0.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a identificação taxonômica.

4.9.2 Identificação taxonômica das leveduras ambientais por Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP)

A identificação taxonômica de leveduras usando reação em cadeia da polimerase por meio da detecção do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi inicialmente descrita por Guillamón *et al.* (1999) e otimizada por Agustini *et al.* (2014).

Para a reação em cadeia da polimerase foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Primeiramente, as leveduras foram crescidas em meio sólido YEPD, pH 5,5, por 48 horas. Em seguida, para cada levedura, foi preparada a suspensão de células com concentração de 10^7 células.mL⁻¹. As suspensões foram congeladas a -20 °C e descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas em vórtex para a extração do material genômico (SILVA *et al.*, 2012).

Para a reação em cadeia da polimerase empregou-se o meio reacional descrito no quadro 2 e as reações foram realizadas em termociclador Proflex – PCR System (Applied Biosystems), de acordo com o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C de 30 segundos, a 60 °C a 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. O programa foi finalizado com 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos (AGUSTINI *et al.*, 2014).

QUADRO 2 - MEIO REACIONAL EMPREGADO PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA NA REAÇÃO DE PCR

Componentes	Concentração
Tris-HCl 200 mmol.L ⁻¹	20 mmol.L ⁻¹
Cloreto de potássio 500 mmol.L ⁻¹	50 mmol.L ⁻¹
Cloreto de magnésio 50 mmol.L ⁻¹	1,5 mmol.L ⁻¹
Nucleotídeos trifosfatados 1 mmol.L ⁻¹	200 µmol.L ⁻¹
Oligonucleotídeos iniciadores (ITS1 e ITS4) 20 µmol.L ⁻¹	0,8 µmol.L ⁻¹
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U.µL ⁻¹	1,5 U
DNA amostral	20 – 40 ng
Volume final	25µL

FONTE: Agustini *et al.* (2014)

Para a detecção dos produtos de PCR, foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em solução tampão TRIS-Borato-EDTA (TBE) 1x, constituído por trisaminometano (TRIS) 90 mmol.L⁻¹, ácido bórico 90 mmol.L⁻¹ e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2,0 mmol.L⁻¹. A cada poço do gel de eletroforese, foi adicionado uma alíquota de 4,5 µL do produto de PCR e 0,6 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%). A separação foi realizada em sistema horizontal, com imersão do gel em tampão TBE 1x, aplicação de voltagem de 120 V por 1 hora e 30 minutos. O marcador de peso molecular empregado foi EasyGen 100bp (EasyPath).

Os produtos de PCR resultantes foram clivados por meio do emprego da endonuclease de restrição *HaeIII* (5' GG↓CC 3'). As preparações das amostras se deram pela adição de 3,5 µL de água ultrapura, 1,0 µL de tampão da enzima, 0,5 µL de enzima e 5,0 µL do produto de PCR. Então, cada tubo de polipropileno foi mantido em estufa a 37 °C, para a reação da enzima *HaeIII* por duas horas, segundo as orientações do fabricante. Este procedimento foi realizado para cada levedura.

Para a detecção dos produtos de clivagem da enzima foi utilizado gel de agarose 3% (p/v) em solução tampão de TBE 1x. Para a aplicação no gel de eletroforese, foi adicionado ao volume total de cada reação, 1,2 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%). Então, o total de cada tubo de polipropileno foi transferido a um dos poços do gel. As condições para a separação eletroforética foram as mesmas utilizadas para a PCR

empregando os *primers* ITS1 e ITS4. O marcador molecular empregado foi 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Brasil).

Para a revelação de todos os géis resultantes das eletroforeses realizadas, imergiu-se cada gel em brometo de etídeo a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 20 minutos e foi visualizado em luz ultravioleta, em comprimento de onda de 302 nm, por meio do programa ImageLab versão 4.1 build 16 (Bio rad laboratories).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos realizados em frascos foram independentes e em triplicata. A média, o desvio padrão, o teste ANOVA e teste *t* Student bidirecional para variáveis independentes foram calculados no software Statistica 8 e os gráficos elaborados no software Graphpad Prism 6. A comparação das médias pelo teste *t* Student foi realizada com 95% de confiança. Para os demais cálculos foi feito uso do pacote Microsoft Office 2011, software Microsoft Excel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima β -frutofuranosidase apresenta atividade de transfrutossilacção a partir da sacarose na concentração de 68 g.L^{-1} , esta atividade é beneficiada com o aumento da concentração do substrato sacarose. Autores consideram que a partir da concentração mínima de 200 g.L^{-1} de sacarose, ocorra a formação de produtos mais estáveis já que a reacção de formação dos fruto-oligossacarídeos é reversível, e há o favorecimento da reacção para a formação dos produtos. Por sua vez, para a enzima frutossiltransferase a concentração de substrato sacarose não interfere na formação dos produtos (STRAATHOF; KIEBOOM; BEKKUM, 1986; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001). Alguns autores sugerem que concentrações de sacarose muito elevadas, apesar de favorecerem a termodinâmica da transfrutossilacção, causam a inibição enzimática por excesso de substrato (ARRIZON et al., 2012).

Assim, tendo em vista que os gêneros e espécies das leveduras ambientais testadas somente foram conhecidos ao final dos experimentos; portanto, não sabia-se qual enzima estava presente, optou-se por utilizar nos meios reacionais a concentração de sacarose de 500 g.L^{-1} para a selecção das leveduras ambientais que apresentassem as enzimas β -frutofuranosidase ou frutossiltransferase.

Em todos os experimentos, cada levedura ambiental, previamente crescidas em meio YEPD (item 4.4 e item 4.5), foi inoculada na concentração de 28 mg de células secas por mililitro de meio reacional.

5.1 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE OU β -FRUTOFURANOSIDASE

A cromatografia em camada delgada é uma técnica adequadamente empregada para a detecção e para o acompanhamento de reacções de transfrutossilacção e hidrólise enzimáticas e químicas para a formação de fruto-oligossacarídeos de grau de polimerização de até cinco unidades de açúcar (VACCARI et al., 2001; BENKEBLIA, 2013). Outros autores utilizaram esta técnica para realizar a detecção de fruto-oligossacarídeos e frutanos; no entanto, somente

foi possível verificar fruto-oligossacarídeos abaixo de dez unidades de açúcar de grau de polimerização (WAGNER; WIEMKEN; MATILE, 1986; FONTANA *et al.*, 2011).

Inicialmente, as fases móveis foram testadas empregando corrida cromatográfica de 4 cm. Verificou-se que para estas condições as fases móveis descritas por Toledo *et al.* (2004) e Oku *et al.* (1984) não foram capazes de realizar a separação cromatográfica. A fase móvel descrita por Toledo *et al.* (2004) realizou a eluição de todos padrões com o mesmo fator de retenção, isto ocorreu devido à grande interação da fase móvel, acetonitrila: água (9:1) com os analitos, à polaridade, às interações de hidrogênio e às interações fracas entre ambos.

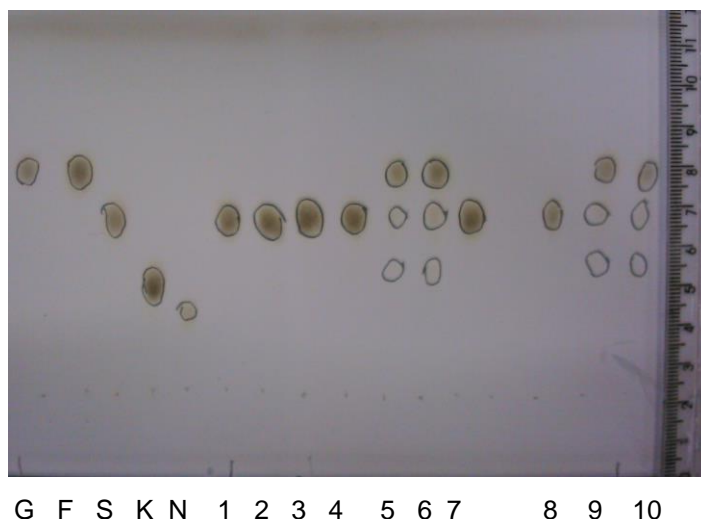
Por sua vez, a fase móvel composta por acetonitrila e água, na proporção 82:18, descrita por Oku *et al.* (1984), não apresentou polaridade suficiente para realizar a eluição dos oligossacarídeos 1-cestose e nistose na placa contendo a fase estacionária sílica gel 60. Os sacarídeos e a sílica apresentam interações de hidrogênio entre si geradas por meio da interação entre orbitais de átomos de hidrogênio e oxigênio das moléculas de sílica e dos carboidratos. Como resultado da pouca interação entre os analitos e os solventes, as bandas cromatográficas permaneceram na origem da corrida cromatográfica.

A técnica descrita por Inthanavong (2011) empregando n-butanol: ácido acético: água (5:4:1), foi capaz de eluir todos os padrões em uma corrida cromatográfica de 4 cm. Entretanto, a fim de facilitar a verificação dos fatores de retenção dos dissacarídeos e monossacarídeos, foi modificada a extensão da corrida cromatográfica para 10 cm.

Em relação as soluções reveladoras, as descritas por Toledo *et al.* (2004), Oku *et al.* (1984) e Inthanavong (2011) foram capazes de revelar os carboidratos presentes nas placas cromatográficas de sílica gel 60. A revelação das placas cromatográficas utilizando solução de difenilamina-anilina-fosfato, conforme Oku *et al.* (1984), apresentou coloração preta para a banda cromatográfica em fundo azul. Por sua vez, a solução de uréia (Toledo *et al.*, 2004) e a solução de 2% de ácido sulfúrico (Inthanavong, 2011) apresentaram bandas cromatográficas escuras, preto ou marrom, em fundo branco o que facilitou a visualização.

A solução reveladora de 2% de ácido sulfúrico foi a selecionada para a visualização de carboidratos, visto que é de fácil preparação e é considerada uma solução reveladora universal para compostos orgânicos; já que o ácido sulfúrico na

temperatura de 90 °C à 100 °C realiza a combustão da matéria orgânica, gerando coloração marrom ou preta (FIGURA 8).



Legenda: G (glucose); F (frutose); S (sacarose);
K (1-cestose); N (nistose); 1-10 (amostras)

FIGURA 8 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA EMPREGANDO FASE MÓVEL N-BUTANOL: ÁCIDO ACÉTICO: ÁGUA (5:4:1) E 2% ÁCIDO SULFÚRICO EM METANOL COMO SOLUÇÃO REVELADORA DAS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO UTILIZANDO CÉLULAS INTEIRAS DE LEVEDURAS E 500 g.L⁻¹ DE SACAROSE COMO MEIO REACIONAL, pH INICIAL DE 4,5 ± 0,2, TEMPERATURA DE 50 °C, AGITAÇÃO 150 rpm

FONTE: O autor (2015)

Após a realização da cromatografia em camada delgada empregando fase móvel n-butanol: ácido acético: água (5:4:1), foram obtidos os fatores de retenção para os padrões, aproximadamente, de 0,60 para a glucose e a frutose, 0,50 para a sacarose, 0,40 para os trissacarídeos, representados pela 1-cestose, e 0,30 para os tetrassacarídeos, representados pela nistose.

A análise das amostras utilizando o meio reacional contendo 500 g.L⁻¹ de sacarose, pH inicial de 4,5 ± 0,2, temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm, por meio da técnica de cromatografia em camada delgada permitiu verificar que das 141 leveduras ambientais avaliadas, 65 leveduras possivelmente apresentavam a capacidade de realizar a transfrutosilação da sacarose, por meio da observação de

bandas cromatográficas correspondentes ao fator de retenção do padrão 1-cestose. Para todas as leveduras ambientais avaliadas em que não foi constatada a formação de trissacarídeos, percebeu-se a formação de monossacarídeos em todos os tempos de reação analisados (3 horas, 6 horas, 9 horas e 12 horas) por meio da formação de banda cromatográfica com fator de retenção de aproximadamente 0,60, valor similar à da glucose e frutose, sendo indistinguível qual monossacarídeo foi formado.

Em relação as 65 leveduras ambientais que foram capazes de formar trissacarídeos, também houve a formação de monossacarídeos no decorrer do tempo de reação e a hidrólise dos oligossacarídeos (FIGURA 9). Após o tempo de reação de 3 horas, foi verificado nas amostras a formação de trissacarídeos em 91,3% das leveduras avaliadas e a formação de monossacarídeos em 96,8% das 65 leveduras. No entanto, nas amostras das leveduras denominadas de 106, 131, 139, 141, 186 e 278 foi constatada a formação de trissacarídeos após o tempo de reação de seis horas e na amostra da levedura 110, somente após nove horas.

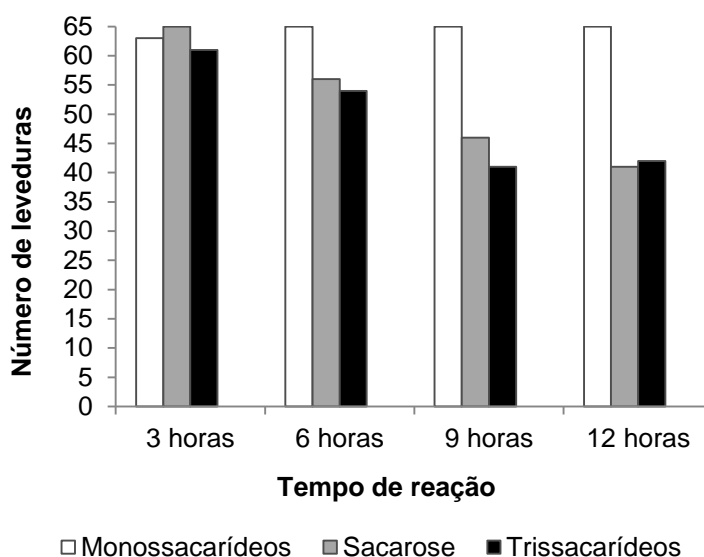


FIGURA 9 – NÚMERO DE LEVEDURAS FORMADORAS DE TRISSACARÍDEOS NOS TEMPOS 3, 6, 9, 12 HORAS DE REAÇÃO EMPREGANDO SOLUÇÃO DE SACAROSE 500 g.L⁻¹ (p/v), pH INICIAL 4,5 ± 0,2, CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS 28 mg.mL⁻¹, 50°C, 150 rpm E A TÉCNICA DE CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA PARA A VERIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS.

Em relação a hidrólise dos oligossacarídeos, somente para as amostras da levedura 53 houve banda cromatográfica correspondente aos oligossacarídeos em todos os tempos de reação (3 horas, 6 horas, 9 horas, 12 horas) analisados.

Sugere-se que o não aparecimento da banda cromatográfica referente aos trissacarídeos a partir de dado tempo de reação seja devido à degradação do produto formado em monossacarídeos. Isto é ocasionado pela hidrólise do complexo enzima-unidade frutossil formado durante as reações de hidrólise reversa, transglucosilação e transfrutossilação, como, também, dos próprios oligossacarídeos formados (STRAATHOF; KIEBOOM; BEKKUM, 1986; ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001).

Após a seleção prévia das leveduras formadoras de oligossacarídeos por meio do emprego da técnica de cromatografia em camada delgada, foi pesquisada e desenvolvida uma metodologia para a identificação e quantificação dos oligossacarídeos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês *high performance liquid chromatography – HPLC*).

Inúmeros trabalhos empregam a cromatografia em fase líquida de alta eficiência para a separação, quantificação e identificação estrutural de carboidratos por meio do uso dos detectores de índice de refração e pulso amperométrico ou ao acoplamento de um espectrômetro de massa ao cromatógrafo (CHEN, 1998; FARINE *et al.*, 2001; FERNANDEZ *et al.*, 2004; LINDE *et al.*, 2009; FIALHO *et al.*, 2013; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013; SHEU *et al.*, 2013). A cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de índice de refração foi escolhida como técnica para a quantificação dos carboidratos formados em todas as reações, para isto foram testadas três colunas cromatográficas e fases móveis constituídas por metanol e água ou acetonitrila e água em diversas proporções; bem como, foram testados os parâmetros de fluxo e injeção de amostra para a otimização da metodologia ao equipamento utilizado.

Inicialmente, foi testada a coluna de cromatografia de fase reversa octadecilsilano (C18) para a qual foi descrito como fase móvel água (LIM *et al.*, 2005; SHEU *et al.*, 2013). No entanto, a coluna cromatográfica Varian Microsorb-MV C18 empregada apresentava orientações do fabricante para que fosse utilizado 10% de solvente orgânico na fase móvel a fim de se evitar o desgaste prematuro da coluna. Assim, foram experimentadas as proporções 10:90, 20:80, 50:50, 80:20 e

70:30 de acetonitrila: água. Para as proporções 10:90, 20:80, 50:50, nenhuma delas foi possível perceber a formação de picos cromatográficos referentes aos padrões, mas, em todas elas, foi visualizada a formação de pico cromatográfico em tempo de retenção semelhante à da água da dissolução dos padrões. Para as proporções de 80:20 e 70:30 não foi possível perceber a formação de nenhum pico cromatográfico.

A metodologia descrita por Chen *et al.* (2004) foi empregada para a fase estacionária octacilsilano (Varian Microsorb-MV C8) utilizando metanol 40% (v/v) como fase móvel (CHEN *et al.*, 2004). A coluna octacilsilano apresenta a vantagem de ter maior polaridade comparativamente à C18 visto que possui menor cadeia carbônica, o que auxilia na retenção dos carboidratos. Entretanto, quando esta metodologia foi empregada não foi possível visualizar a formação de nenhum pico cromatográfico.

Por sua vez, utilizando a coluna da marca Supelco, modelo Supelcosil LC-NH₂, foi possível realizar a separação cromatográfica e a quantificação dos carboidratos, visto que o radical amino presente na coluna interage com os radicais hidroxila das moléculas dos carboidratos; assim, realizando separação das moléculas por afinidade. As moléculas de carboidratos são separadas por ordem de grau de polimerização e polaridade. Para a eluição das amostras na coluna Supelcosil LC-NH₂ foram testadas as fases móveis constituídas de acetonitrila: água nas proporções 80:20 (CRUZ *et al.*, 1998), 75:25 (DORTA *et al.*, 2006) e 70:30 (MUSSATTO *et al.*, 2009).

As proporções 75:25 e 70:30 não foram eficientes para o sistema cromatográfico, já que quando foi utilizado o fluxo de fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹ e a injeção de amostra de 20 µL foi visualizado a co-eluição dos padrões glucose e frutose.

Entretanto, quando foi utilizada a fase móvel descrita por Cruz *et al.* (1998), foi percebido a separação dos picos cromatográficos da glucose e da frutose. Em relação ao fluxo desta fase móvel, foram avaliados três valores de fluxos previamente: 0,9 mL.min⁻¹, 1,0 mL.min⁻¹ e 1,1 mL.min⁻¹. O fluxo de fase móvel de 1,1 mL.min⁻¹ impossibilitava a separação dos picos cromatográficos dos monossacarídeos, enquanto a diminuição do fluxo para 0,9 mL.min⁻¹ aumentava o tempo de análise e alargava os picos cromatográficos referentes à 1-cestose e a nistose. Em relação ao volume de injeção de amostra, foram testados os volumes de

10 μL , 20 μL , 30 μL e 40 μL e não foi verificada diferença nos cromatogramas gerados.

Assim, as seguintes condições foram estabelecidas para a separação e quantificação dos carboidratos utilizando a coluna Supelcosil LC-NH₂: fase móvel acetonitrila: água (80:20), fluxo de fase móvel 1,0 mL.min⁻¹ e injeção de amostra de 20 μL .

A presença dos carboidratos, glicose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, foi identificada pela semelhança dos tempos de retenção relativos entre eles e os padrões. A quantificação dos carboidratos foi calculada por meio de equações das curvas padrão, que relacionam as concentrações com as áreas dos picos cromatográficos.

Os tempos de retenção relativos, as equações de reta das curvas padrão, os coeficientes de determinação e a amplitude de concentração avaliada encontram-se no quadro 3. As curvas padrão foram repetidas a cada corrida cromatográfica e em triplicata.

QUADRO 3 - TEMPOS DE RETENÇÃO RELATIVO, FAIXA DE CONCENTRAÇÃO QUANTIFICADA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA CADA PADRÃO

Padrões	Tempo de Retenção relativo* (minutos)	Faixa de Concentração (g.L ⁻¹)	Equação da Reta	R ^{2**}
Frutose	2,88	0,10 - 10,00	y=654926x-58077	0,99598
Glucose	3,376	0,10 - 10,00	y=639942x-34,251	0,99924
Sacarose	4,774	0,10 - 20,00	y=758439x+296170	0,99642
1-cestose	8,325	0,10 - 5,00	y=750048x+23655	0,99748
Nistose	12,404	0,10 - 5,00	y=657976x+45129	0,99670

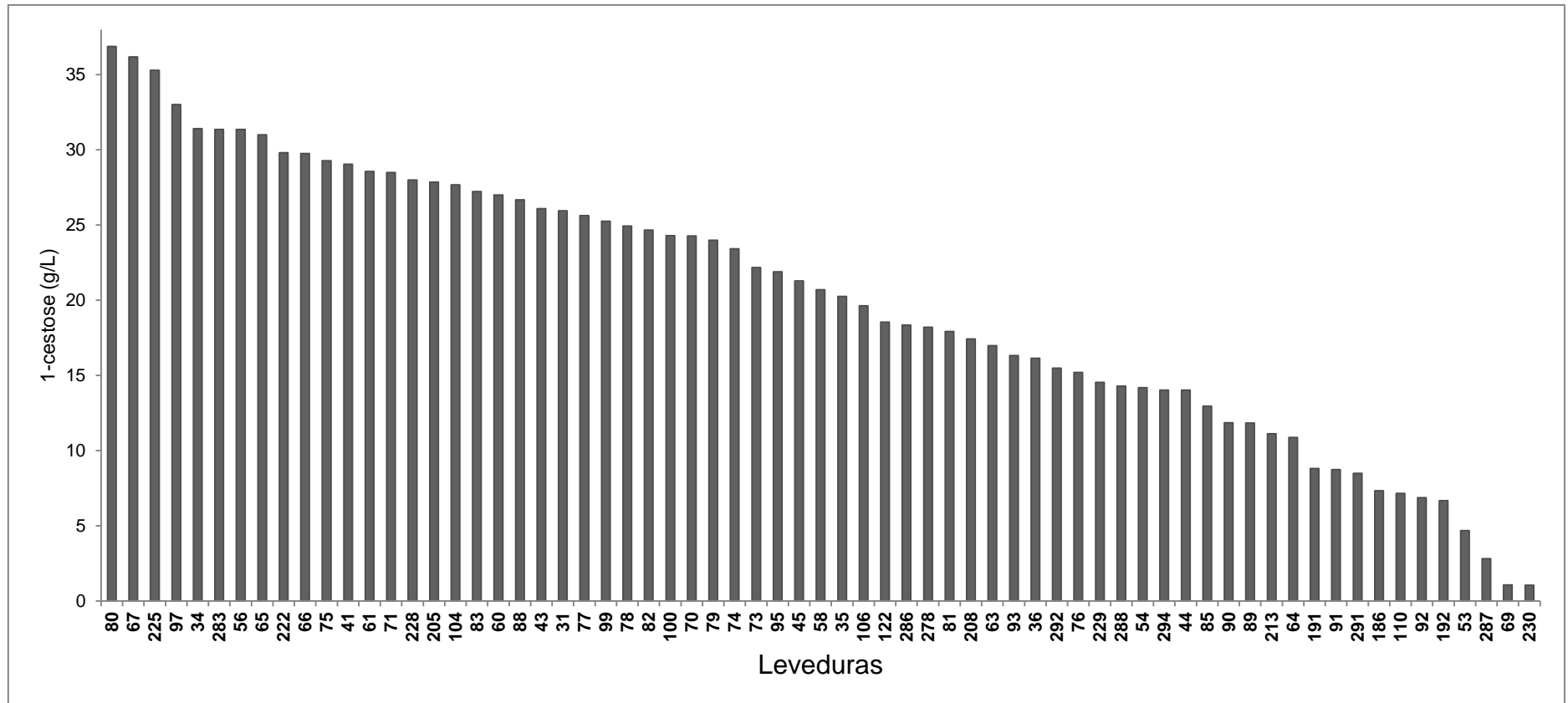
* Tempo de retenção relativo refere-se ao tempo de retenção do padrão subtraído do tempo de retenção do solvente utilizado (água ultrapura), minimizando erros entre análises cromatográficas.

** R² refere-se à coeficiente de determinação. Um valor próximo à 1 indica que a equação da reta está adequada para a metodologia empregada.

FONTE: O Autor (2015)

Com a metodologia de identificação e quantificação de carboidratos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência padronizada, as amostras de sobrenadantes dos tempos de reação de três horas ou seis horas referentes às leveduras que apresentaram bandas cromatográficas, na cromatografia em camada delgada, com fator de retenção equivalentes aos trissacarídeos (FIGURA 8, p. 49) tiveram seus carboidratos quantificados e identificados. Para as 65 leveduras formadoras de trissacarídeos, foi confirmada a presença de picos cromatográficos com tempos de retenção equivalentes a glucose, a frutose, a sacarose e a 1-cestose. Em relação a formação de 1-cestose, na figura 9 estão demonstrados os resultados preliminares das concentrações produzidas pelas enzimas frutossiltransferase ou β -frutofuranosidase das 65 leveduras submetidas a seleção. As concentrações de 1-cestose variaram entre 1 g.L^{-1} a 37 g.L^{-1} .

De acordo com os dados preliminares apresentados na figura 10 foram selecionadas aleatoriamente as leveduras 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225, 283 que apresentaram as maiores concentrações preliminares de 1-cestose (g.L^{-1}) para os experimentos de verificação da influência da temperatura e do pH na atividade de hidrólise e de transfrutossilacção das enzimas frutossiltransferase ou β -frutofuranosidase destas leveduras.



* Concentrações de 1-cestose (g.L^{-1}) determinadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de índice de refração utilizando coluna Supelcosil NH_2 , 5 μm de partícula, 250x46 mm, fase móvel acetonitrila: água (80:20), fluxo $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e injeção 20 μL de amostra.

FIGURA 10 - CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE DETERMINADAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E OBTIDAS POR AÇÃO DAS ENZIMAS FRUTOSILTRANSFERASE OU β -FRUTOFURANOSIDASE DAS LEVEDURAS AMBIENTAIS NAS CONDIÇÕES DE INÓCULO DE 28 mg DE CÉLULAS SECAS. mL^{-1} DE MEIO REACIONAL CONSTITUÍDO DE 500 g.L^{-1} , pH $4,5 \pm 0,2$, 50 °C, 150 rpm.

FONTE: O Autor (2015)

5.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS pH E TEMPERATURA PARA AS REAÇÕES DE TRANSFRUTOSILAÇÃO DAS ENZIMAS DAS LEVEDURAS SELECIONADAS

As atividades de hidrólise e de transfrutosilação das enzimas frutossiltransferase ou β -frutofuranosidase são influenciadas pela temperatura e pelo valor de pH (ANTOSOVÁ; POLAKOVIC, 2001; MUSSATTO *et al.*, 2009). Para verificar a influência destes fatores na formação de fruto-oligossacarídeos pelas oito leveduras selecionadas, foram utilizados meios reacionais com os valores de pH de 4,5, 5,5 e 6,5 e empregadas as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C (item 4.7). Também foram usados como controle negativo frascos de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio reacional, solução de sacarose, em todas as reações, pois poderia haver modificações na concentração e a hidrólise da sacarose devido às altas temperaturas e aos valores de pH. Após as análises das amostras consideradas controle negativo não foi constatada a presença de outros açúcares que não a sacarose durante o período de reação. No entanto, foi percebido um aumento da concentração de sacarose devido à evaporação da água ocasionado pela temperatura elevada durante o período de reação. Por este motivo, para os cálculos das concentrações dos carboidratos, expresso em porcentagem, foi necessário empregar a concentração de sacarose determinada para os controle negativo ao fim de seis horas de reação.

Após seis horas, houve uma diminuição média da concentração de sacarose de cerca de 90% em relação a concentração inicial. Deste total de 90%, quando foram utilizadas as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, ocorreu a formação de 58%, 74,7% e 79,3% de monossacarídeos, respectivamente.

Na tabela 1 estão apresentados os resultados das concentrações obtidas de 1-cestose (g.L^{-1}) pela ação das enzimas de cada levedura selecionada nas diferentes condições de valor de pH e temperatura, como também o valor de p , calculado pelo teste t Student, com 5% de significância, para cada condição empregada nos experimentos. De acordo com os dados apresentados na tabela 1, em relação as concentrações de 1-cestose (g.L^{-1}) houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores das concentrações de 1-cestose apresentadas para cada levedura nos experimentos em que utilizou-se o valor de pH de 4,5 no meio

reacional, para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C e também houve diferenças significativas na concentração de 1-cestose produzida nos experimentos conduzidos nos valores de pH 5,5 e 6,5 no meio reacional para as temperaturas de 40 °C e 60 °C. Entretanto, quando foi utilizado nos experimentos a temperatura de 50 °C e os valores de pH de 5,5 ($p=0,149$) e de 6,5 ($p=0,068$) nos meios reacionais, não houve diferenças significativas entre os valores das concentrações de 1-cestose apresentadas para cada levedura testada.

Com a finalidade de verificar qual a levedura entre as oito leveduras ensaiadas apresentou o melhor desempenho na formação de fruto-oligossacarídeos, em relação aos parâmetros valor de pH e temperatura, os resultados dos experimentos também estão representados na figura 12.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE (g.L^{-1}) PARA CADA LEVEDURA SELECIONADA EM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS pH e TEMPERATURA

Leveduras Seleccionadas	1-cestose (g.L^{-1}) ^{e**}								
	Temperatura de 40°C			Temperatura de 50°C			Temperatura de 60°C		
	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5
34	8,77 ± 1,83	2,43± 1,03	0,00	9,54± 0,31	3,05± 2,62	9,73± 2,09	0,23± 0,04	0,00	0,00
67	0,00	6,29± 1,11	4,06± 2,30	20,39± 2,90	0,00	6,87± 3,83	0,71± 0,47	12,17± 4,59	0,71± 0,47
80	16,53± 3,34	6,29± 1,37	4,58± 1,82	10,45± 1,15	0,00	7,86± 1,14	8,76± 2,13	0,00	10,25± 3,26
97	19,00± 1,91	5,34± 1,53	23,25± 1,88	9,76± 3,17	0,00	8,09± 2,88	0,00	0,00	4,54± 2,88
205	6,34± 1,11	3,75± 0,38	0,42± 0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
222	3,19± 1,18	2,32± 0,83	5,82± 2,56	3,89± 2,56	2,45± 1,47	10,69± 5,59	6,52± 2,33	9,38± 1,76	10,54± 1,59
225	9,94± 1,93	14,78± 1,02	12,69± 2,83	10,86± 1,73	0,00	8,22± 1,95	23,47± 1,88	4,70± 2,03	0,08± 0,04
283	0,00	13,25± 4,05	11,36± 3,21	6,53± 1,99	0,00	0,54± 0,27	0,00	0,00	1,02± 0,80
p***	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,149	0,068	< 0,001	0,023	0,001

* A técnica empregada para a detecção e quantificação de 1-cestose foi a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de índice de refração utilizando coluna Supelcosil NH₂, 5 µm de partícula, 250x46 mm, fase móvel acetonitrila água (80:20), fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e injeção 20 µL de amostra.

** As concentrações de 1-cestose foram calculadas pela média aritmética da triplicata independente empregada no experimento e os seus desvios padrões.

*** Valor de p para teste t Student com 5% de significância.

FONTE: O Autor (2015)

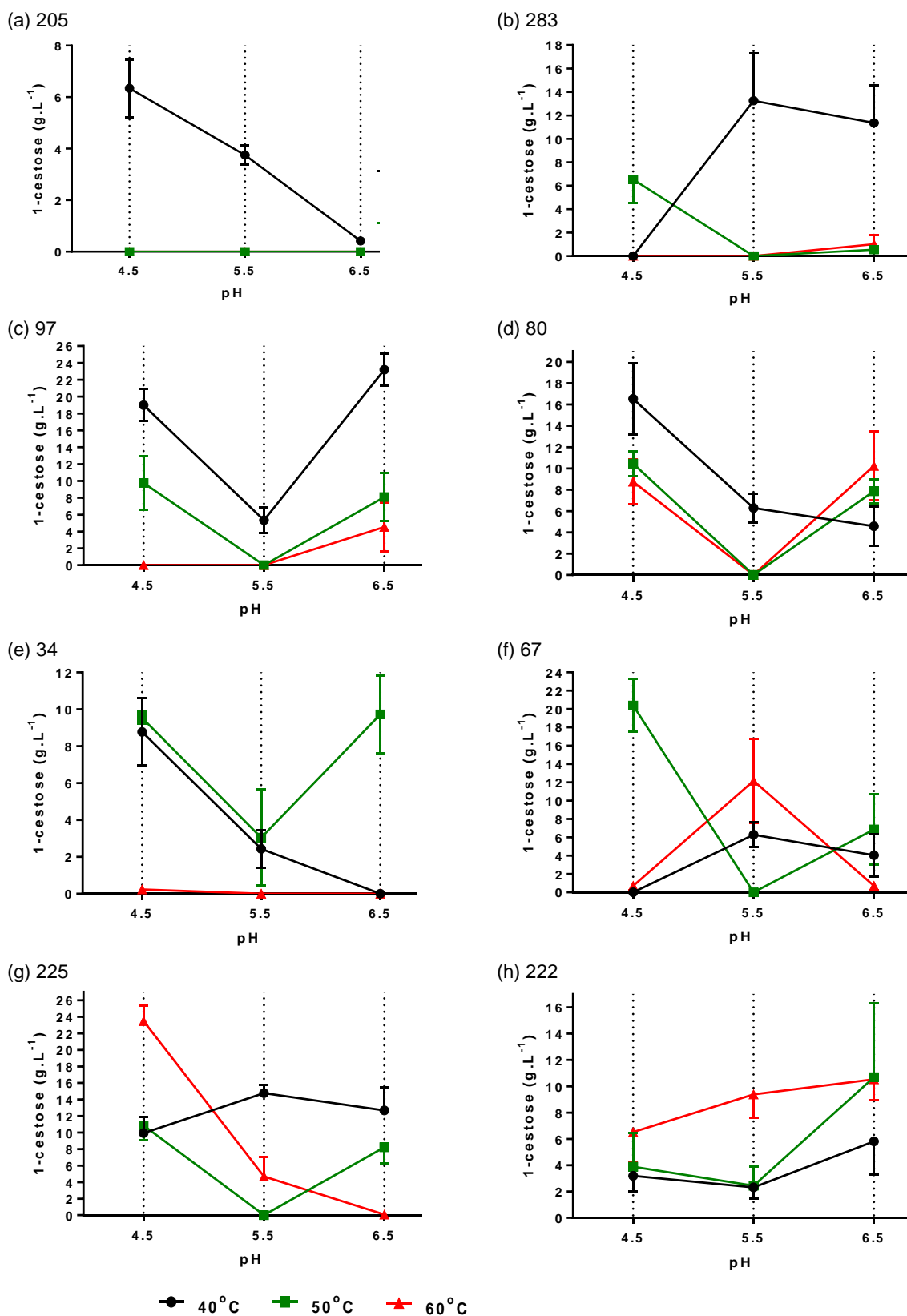


FIGURA 11 – CONCENTRAÇÕES DE 1-CESTOSE (g.L⁻¹) NAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO EMPREGANDO OS VALORES DE pH DE 4,5, 5,5 E 6,5 E AS TEMPERATURAS DE 40 °C, 50 °C E 60 °C PELAS LEVEDURAS 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225, 283.

* A técnica empregada para a detecção e quantificação de 1-cestose foi a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com detector de índice de refração utilizando coluna Supelcosil NH₂, 5 µm de partícula, 250x46 mm, fase móvel acetonitrila água (80:20), fluxo 1,0 mL.min⁻¹ e injeção 20 µL de amostra.

FONTE: O Autor (2015)

Dentre as leveduras utilizadas nos experimentos, a levedura 205 formou 1-cestose nas reações com valores de pH, de 4,5, 5,5 e 6,5, somente na temperatura de 40 °C (figura 12a), e a maior concentração foi no valor de pH 4,5 ($6,34 \pm 1,11 \text{ g.L}^{-1}$). Em relação aos valores de pH testados nas reações, verificou-se que o aumento do valor de pH na temperatura de 40 °C ocasionou a diminuição da formação de 1-cestose (transfrutossilação) e aumentou a formação dos monossacarídeos (hidrólise). Para a temperatura de 40 °C, ocorreu a formação de monossacarídeos (glucose e frutose somados), de $340,84 \pm 8,99 \text{ g.L}^{-1}$ para o valor de pH 4,5, e de $415,95 \pm 39,07 \text{ g.L}^{-1}$ para o valor de pH 6,5. Nas reações utilizando a levedura 205 também verificou-se a diminuição da concentração média de sacarose de 97%.

A levedura 283 também apresentou formação de 1-cestose na temperatura de 40 °C; entretanto, somente nos valores de pH 5,5 e 6,5 com concentração de $13,25 \pm 4,05 \text{ g.L}^{-1}$ e $11,36 \pm 3,21 \text{ g.L}^{-1}$ (figura 12b), respectivamente. A levedura 67 (figura 12f), igualmente à levedura 283, não formou 1-cestose nas condições de valor de pH 4,5 e temperatura de 40 °C, diferente do que foi observado para a levedura 205 (figura 12a). Para a levedura 283, na temperatura de 40 °C os valores obtidos de monossacarídeos correspondem à 67,8%, 88,3% e 52,6%, para os valores de pH de 4,5, 5,5 e 6,5, respectivamente. Nas reações empregando a levedura 283 verificou-se a diminuição da concentração de sacarose de 93,5%.

Observa-se na figura 12c para a levedura 97, a maior formação de 1-cestose (g.L^{-1}) na temperatura de 40 °C e o valor de pH de 6,5 em que a concentração de 1-cestose foi de $23,20 \pm 1,88 \text{ g.L}^{-1}$. Nestas condições, ocorreu a menor formação de monossacarídeos, $284,38 \pm 21,59 \text{ g.L}^{-1}$. A levedura 97 apresenta a maior concentração de 1-cestose formada na temperatura de 40 °C como o ocorrido para as leveduras 205 e 80 (figura 11d). Em relação a diminuição da concentração de sacarose, de substrato, a enzima catalisou a reação de transfrutossilação ou hidrólise em cerca de 91% de sacarose, na melhor condição de formação de 1-cestose aproximadamente 70% de sacarose foi utilizada.

De acordo com as figuras 12d e 12a, a levedura 80 semelhante a levedura 205, nas condições de temperatura de 40 °C e o valor de pH 4,5, apresenta a maior formação de 1-cestose, com a concentração de $16,53 \pm 3,53 \text{ g.L}^{-1}$. Para as temperaturas de 50 °C e 60 °C, no valor de pH de 6,5, ocorre a formação de 1-cestose com concentrações de $7,86 \pm 1,14 \text{ g.L}^{-1}$ e $10,25 \pm 2,13 \text{ g.L}^{-1}$,

respectivamente, mas para estas temperaturas, no valor de pH de 5,5, não foi possível detectar a concentração de 1-cestose por cromatografia, sendo considerada zero. Em relação a formação de monossacarídeos pela levedura 80, nas reações em que foram empregados os valores de pH de 4,5, de 5,5 e de 6,5, da concentração inicial de sacarose, 77,5%, 80,2% e 72,9% foi de monossacarídeos, respectivamente. Os resultados obtidos dos experimentos sugerem que para a atividade de hidrólise, o valor de pH não parece exercer influência.

Para a levedura 34, figura 11e, na temperatura de 50 °C, valores de pH 4,5 e 6,5 e na temperatura de 40°C, valor de pH de 4,5, ocorreram a formação das maiores concentrações de 1-cestose, sendo cerca de 9,72 g.L⁻¹. Na temperatura de 50 °C, as porcentagens obtidas de monossacarídeos foram de 76,2% para o valor de pH 4,5; de 77,0% para o valor de pH 5,5 e de 82,9% para o pH 6,5. Observa-se pelos resultados, para a temperatura de 50 °C, que para a levedura 34 nas condições em que houve a formação das maiores concentrações de 1-cestose, não ocorreram as menores concentrações de monossacarídeos, em desacordo com os mecanismos das reações utilizando enzimas. Em relação a sacarose, constatou-se a diminuição média da concentração de sacarose de 95,9%

A levedura 67 apresentou a maior concentração de 1-cestose formada na temperatura de 50 °C, mas apresenta o melhor valor de pH para a formação de 1-cestose somente no valor de 4,5 (figura 12f), diferentemente da levedura 34. Nestas condições a concentração de 1-cestose formada pela levedura 67 é de 20,39 ± 2,90 g.L⁻¹. Para esta levedura, verificou-se que no valor de pH de 4,5 ocorreu a menor formação de monossacarídeos, 57,25% e para os valores de pH de 5,5 e 6,5 há a formação de 79,8% e 71,35%, respectivamente. Considerando a formação de 1-cestose e de monossacarídeos pela levedura 67, percebe-se que para o valor de pH de 4,5 a atividade de transfrutoseilação é favorecida, visto que para este valor de pH a concentração de 1-cestose é maior e de monossacarídeos é menor; no entanto, para o valor de pH 5,5 nota-se uma maior atividade hidrolítica.

Para a levedura 225 houve uma diminuição da concentração inicial de sacarose de, em média, 94% e a formação de 23,47 ± 1,88 g.L⁻¹ de 1-cestose, nas condições de temperatura 60 °C e valor de pH de 4,5 (figura 12g). Este valor de concentração de 1-cestose foi semelhante ao obtido para a levedura 97, nas condições reacionais de temperatura de 40°C e valor de pH de 6,5 (figura 12c). Ainda, para a levedura 225, na temperatura de 60 °C ocorreu a diminuição da

formação de fruto-oligossacarídeo devido ao aumento do valor de pH do meio reacional. Também foi verificado que o aumento do valor de pH do meio de reação diminuiu a porcentagem de monossacarídeos produzida, que foi de 86%, 81,5% e 73% para os valores de pH de 4,5, 5,5 e 6,5, respectivamente.

Conforme representado na figura 12h, para a levedura 222 nas temperaturas de 60 °C e de 50°C, no valor de pH de 6,5, houve a formação de concentrações semelhantes de 1-cestose, de aproximadamente $10,54 \pm 1,59 \text{ g.L}^{-1}$, também sem diferença significativa comparativamente à concentração de 1-cestose obtida na temperatura de 60°C e valor de pH de 5,5. Entre as oito leveduras ensaiadas, foi percebido que a levedura 222 foi a única a formar 1-cestose em todas as condições utilizadas de temperatura e de valor de pH. Além disso, diferentemente das demais leveduras utilizadas, a enzima presente nesta levedura também foi capaz de sintetizar o fruto-oligossacarídeo nistose nas condições reacionais de valor de pH 4,5, nas temperaturas de 40 °C ($1,31 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$ de nistose), 50 °C ($14,89 \pm 0,39 \text{ g.L}^{-1}$ de nistose) e 60 °C ($4,19 \pm 1,97 \text{ g.L}^{-1}$ de nistose). A concentração máxima obtida para 1-cestose e nistose somadas foi de $18,79 \pm 1,23 \text{ g.L}^{-1}$ na condição reacional de 50 °C, valor de pH 4,5. Em relação à formação dos monossacarídeos para a levedura 222, foi observado que para o valor de pH 4,5 ocorreu a maior formação de monossacarídeos, 43,4% da concentração de sacarose inicial, enquanto que para as reações com os valores de pH 5,5 e 6,5 estas porcentagens foram de 18,8% e de 26,5%. Esses resultados mostram que a hidrólise realizada pela enzima da levedura 222 parece ter sido favorecida nas reações com os valores de pH mais ácidos.

Aguiar-Oliveira e Maugeri (2011) estudaram a termoestabilidade da enzima frutossiltransferase da levedura *Rhodotorula sp.* LEB-V10 e verificaram uma pronunciada perda da atividade a partir de 61 °C e os autores sugerem que a diminuição da concentração de fruto-oligossacarídeos com o aumento da temperatura pode ser devido à falta de estabilidade das enzimas à dada temperatura e consequente incapacidade de realizar a sua atividade de transfrutossilacção. A perda de atividade, descrita por Aguiar-Oliveira e Maugeri (2011), também pode ter ocorrido com as enzimas das leveduras 34, 205 e 283 e ser o motivo da não formação de 1-cestose quando foi empregada a temperatura de 60 °C, em qualquer condição de valor de pH utilizada, nos experimentos.

Ghazi *et al.* (2007) verificaram que para a enzima isolada de *Aspergillus aculeatus* a temperatura ótima para a sua atividade era entre 50 °C e 65 °C e que a partir desta temperatura houve a inativação da enzima (GHAZI *et al.*, 2007). Assim como, descrito por YUN (1996), a maioria das enzimas frutossiltransferase ou β -frutofuranosidase apresentam a maior atividade em temperaturas entre 55 °C e 60 °C (YUN, 1996). As temperaturas de 50 °C e 60 °C, na condição de valor de pH 6,5, foram as temperaturas ótimas para a formação de 1-cestose para a levedura 222, similares às descritas por Ghazi *et al.*(2007) e Yun (1996).

Por sua vez, outros autores já demonstraram que a produção de fruto-oligossacarídeos pode ser favorecida em temperaturas mais baixas. Fernandez *et al.* (2004) realizaram a produção de fruto-oligossacarídeos por meio do emprego da enzima isolada de *Aspergillus sp.* 27H isolada do solo. Estes autores verificaram que um aumento na temperatura favorecia um aumento nas atividades de hidrólise e transfrutossilação da enzima β -frutofuranosidase presente no fungo filamentosos. Contudo, verificaram que o emprego de temperaturas mais baixas ocasionava uma maior atividade de transfrutossilação em relação à atividade de hidrólise e constataram que nas condições de temperatura de 40 °C e valor de pH 5,5 ocorria a melhor produção de fruto-oligossacarídeos (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Da mesma forma que Fernandez *et al.* (2004), a temperatura de 40 °C e o valor de pH 5,5, favoreceu a maior formação de 1-cestose para a levedura 283.

Em outro trabalho realizado por Fernandez *et al.* (2007) em que foram selecionados fungos filamentosos potencialmente produtores de fruto-oligossacarídeos, os autores verificaram que em alguns experimentos não havia diferença significativa entre a concentração produzida de 1-cestose para as reações realizadas a 40 °C e 50 °C. Também não houve diferença significativa para a concentração 1-cestose formada nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, valor de pH 4,5, pelas leveduras 80 e 225. Bem como, para a levedura 222, nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, no valor de pH 6,5.

Assim como a temperatura, o valor de pH, favorece as taxas de atividades hidrolítica ou de transfrutossilação, além de influenciar a velocidade em que estas atividades ocorrem (FERNANDEZ *et al.*, 2007).

Kurakake *et al.* (1996) demonstraram que a modificação no valor de pH do meio reacional pode ser utilizada como meio para controlar o favorecimento da hidrólise ou da transfrutossilação. Estes autores verificaram que os meios de reação

com valor de pH 5,0 favorece a hidrólise da sacarose pela enzima β -frutofuranosidase do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, enquanto no valor de pH 8,0 favorece a transfrutossilacção. Estes autores também verificaram que nas reacções com o valor de pH 8,0 a concentração de fruto-oligossacarídeos permanecia constante, isto é devido a estabilização da molécula e consequente aumento da resistência à hidrólise em pH básico (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996). Ainda, outros demonstram que a actividade de transfrutossilacção é favorecida em pH ácido. Autores verificaram que para a enzima β -frutofuranosidase do fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* e para enzima da levedura *Rhodotorula daiarensis* o valor de pH óptimo para a actividade de transfrutossilacção é de pH 5,5 (CRUZ *et al.*, 1998; ÁLVARO-BENITO *et al.*, 2007; NING *et al.*, 2010).

Outros autores verificaram que a variação de pH não alterava as actividades de transfrutossilacção e hidrólise da enzima estudada (MADLOVA *et al.*, 1999).

Neste trabalho os valores de 1-cestose calculados pela média aritmética demonstram que quando o valor de pH das reacções foi mantido em 4,5 pelo tampão acetato houve favorecimento da formação de 1-cestose em qualquer temperatura testada. No valor de pH 4,5, também houve a menor formação de monossacarídeos, 31,45%.

A influência do pH nas actividades de hidrólise e transfrutossilacção, bem como em suas velocidades de reacção parecem estar relacionadas a afinidade do substrato ao sítio de ligação nos diferentes valores de pH. Acredita-se que para a enzima β -frutofuranosidase de *Aspergillus oryzae*, para o valor de pH alcalino, o sítio activo da enzima apresenta modificações conformacionais que favoreçam a transfrutossilacção (KURAKAKE; ONOUE; KOMAKI, 1996). Estas modificações estruturais podem ser causadas pela ionização de aminoácidos em diferentes valores de pH no sítio activo da enzima. Modificações extremas podem levar à desnaturação das enzimas. Além disso, a modificação do valor de pH causa alterações de dissociação no substrato e no meio reacional que podem facilitar, retardar ou anular a ligação entre o sítio enzimático e o substrato e, consequentemente, a realização da reacção enzimática (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Os fruto-oligossacarídeos, em escala comercial, são obtidos por meio da imobilização de células de *Aspergillus niger* ou *Aureobasidium pullulans* utilizando uma solução de sacarose de 60 a 70% (p/v) e gerando uma produtividade de até

60% em fruto-oligossacarídeos (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005b). Ganaie et al. (2014) descreveram que existem mais de 30 micro-organismos diferentes que já foram selecionados com um potencial emprego industrial (GANAIE; LATEEF; GUPTA, 2014).

Neste trabalho, utilizando célula íntegra de leveduras obteve-se a formação de cerca de 4,7% (p/v) de fruto-oligossacarídeos pela levedura 97, nas condições de temperatura 40 °C e valor de pH de 6,5, e levedura 225 em valor de pH 4,5 e temperatura de 60 °C. Este resultado é semelhante ao encontrado por Farine *et al.* (2001) em que os autores apresentaram a formação de fruto-oligossacarídeos por meio do emprego da enzima β -frutofuranosidase (invertase) isolada de fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*), em solução de sacarose de 0,2 mol.L⁻¹ em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, 55 °C, em que obtiveram a porcentagem máxima de fruto-oligossacarídeos de 5%.

Em 2014, Khandekar *et al.* verificaram a influência do valor de pH na formação de fruto-oligossacarídeos pela enzima purificada invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, os autores verificaram que a 55 °C, o melhor valor de pH para a síntese de fruto-oligossacarídeos foi de 5,5. Para este valor de pH, foram testadas as temperaturas de 40 °C e 55 °C, com maior produção de fruto-oligossacarídeos na última condição. Após a otimização da concentração de enzima empregada (6 U.mL⁻¹), obteve-se 10% de fruto-oligossacarídeos em relação à concentração inicial de sacarose (525 g.L⁻¹) (KHANDEKAR *et al.*, 2014).

Gutierrez-Alonso *et al.* (2009) pesquisaram a formação de fruto-oligossacarídeos pela enzima β -frutofuranosidase da levedura *Rhodotorula daierensis* CECT 1416 e foi verificado no valor de pH de 5,0 e na temperatura de 50 °C a melhor atividade da enzima purificada e que entre as temperaturas de 40-60 °C não ocorreu desnaturação da enzima. O tempo empregado para a obtenção da concentração máxima foi de 71 horas para a enzima purificada da levedura *Rhodotorula daierensis* CECT 1416, com concentrações de 68,9 g.L⁻¹, 10,6 g.L⁻¹, 2,6 g.L⁻¹ e 12,7 g.L⁻¹ para 6-cestose, neocestose, 1-cestose e tetrassacarídeos. Entretanto, nos experimentos utilizando as oito leveduras selecionadas foi avaliado um período de 6 horas de reação, um tempo aproximadamente 12 vezes menor quando comparado à Gutierrez-Alonso *et al.* (2009), e obteve-se a produção máxima de 23,20 \pm 1,88 g.L⁻¹ de 1-cestose pela levedura 97, concentração em torno de nove vezes maior que a apresentada por Gutierrez-Alonso *et al.* (2009).

5.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LEVEDURAS

A identificação taxonômica por meio das técnicas de espectrometria de massa MALDI-TOF e PCR-RFLP foi realizada somente para as oito leveduras ambientais escolhidas aleatoriamente dentre as leveduras que apresentaram as maiores concentrações de 1-cestose e foram utilizadas para a determinação dos parâmetros pH e temperatura para as atividades hidrolítica e de transfrutossilação.

Os espectros de massa obtidos das amostras foram comparados aos do banco de dados Biotyper (versão 3.0.1, Bruker Daltonics). Após a comparação das relações massa/carga dos picos, o programa calcula os valores de log score, que podem variar entre 0 e 3, para as espécies de leveduras mais prováveis. Segundo o manual da Bruker para o banco de dados Biotyper, valores de log score entre: 2,3 – 3,0 - indicam identificações altamente provável da espécie; 2,0 - 2,29 indicam identificações seguras do gênero, prováveis identificação da espécie; 1,7 – 1,99 indicam provável identificações do gênero; e entre 0,0 - 1,69 indicam identificações não confiáveis devido à falta de correspondência do espectro de massa obtido e àqueles presentes no banco de dados.

Stevenson *et al.* (2010), Pinto *et al.* (2011) e Agustini *et al.* (2014) consideraram valores superiores a 1,8 confiáveis para a identificação taxonômica de gênero e espécie. STEVENSON *et al.* (2010) obtiveram valores de log scores ≥ 1.8 para todos os micro-organismos identificados em gênero e espécie. PINTO *et al.* (2011) demonstraram por meio de PCR-RFLP e sequenciamento genético, que para todos os resultados que apresentavam valores de log score que confirmavam apenas o gênero dos micro-organismos, a comparação dos espectros de massa gerados também apresentava a correta informação para a espécie destes micro-organismos.

Neste trabalho, inicialmente, estabeleceu-se que para uma análise em duplicata da amostra, se ambas apresentassem o valor de log score acima de 2,0, a identificação de gênero e espécie estaria confirmada. No entanto, as oito leveduras foram submetidas à PCR-RFLP para a confirmação de gênero e espécie e verificação da possibilidade de valores de log score inferiores a 2,0 e acima de 1,8

também confirmassem o gênero e a espécie da levedura. Por meio da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF foi possível identificar seguramente uma leveduras testadas (QUADRO 4). As leveduras 34, 80, 97 e 283 apresentaram valores de log score entre 1,8 e 2,0, a levedura 222 apresentou valor de log score abaixo de 1,8 e duas leveduras não foram identificadas por esta técnica (205 e 225).

QUADRO 4 - RELAÇÃO ENTRE A DENOMINAÇÃO NUMÉRICA DA LEVEDURA, A IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E O ÍNDICE DE LOG SCORE

Leveduras	Identificação Taxonômica	Log Escore
34	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,949 e 1,901
67	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,055 e 2,149
80	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,832 e 1,888
97	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,947 e 1,867
205	Não Identificada	-
222	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,786
225	Não Identificada	-
283	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,867 e 1,867

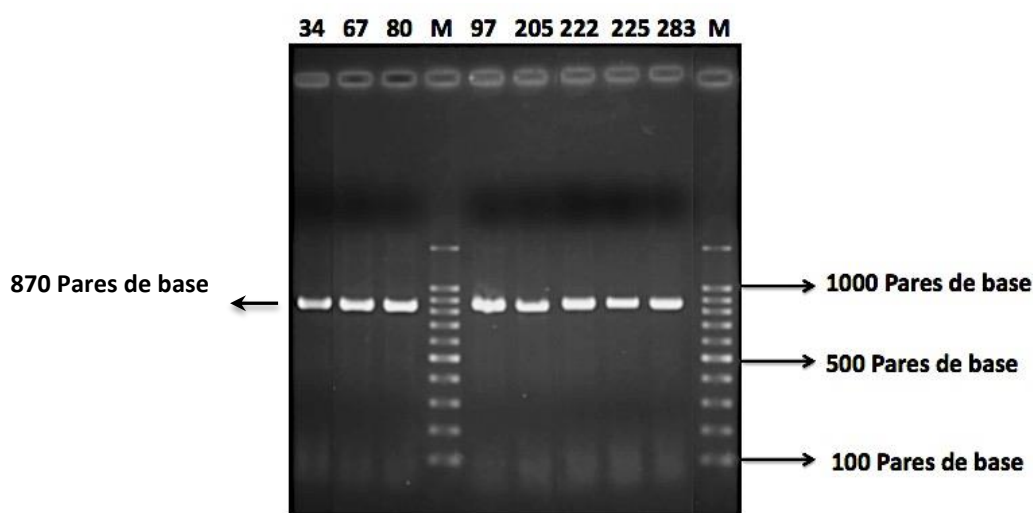
FONTE: O Autor (2015)

A variabilidade entre os valores de log score para uma mesma espécie pode ser devido a variações na expressão gênica entre cepas da mesma espécie de levedura, bem como, por uma extração proteica ineficaz que podem influenciar na obtenção do espectro de massa (CHENG *et al.*, 2013; AGUSTINI *et al.*, 2014).

Por meio da reação em cadeia da polimerase empregando os primers ITS1 e ITS4 foi realizada a amplificação dos pares de base que compreendem uma região do RNA ribossomal repetitiva que incluem duas regiões não codificadoras denominadas de espaçadores internos de transcrição (ITS1 e ITS2) e o gene 5.8S rRNA (GUILLAMÓN *et al.*, 1998).

No presente trabalho verificou-se que o produto de reação de PCR das leveduras 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225 e 283 apresentaram banda de eletroforese em torno de 870 pares de base (FIGURA 12). Para Guillamón *et al.* (1998) e Pham *et al.* (2011), produtos de PCR com tamanho de 880 pares de base são

característicos para as leveduras *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. Para Granchi *et al.* (2001) e Fernandez-Espinar *et al.* (2000), os tamanhos dos *amplicons* gerados são de 850 pares de base para estas leveduras (GRANCHI *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000). Fujita *et al.* (2001) obtiveram para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* *amplicon* com o tamanho de 837 pares de base.



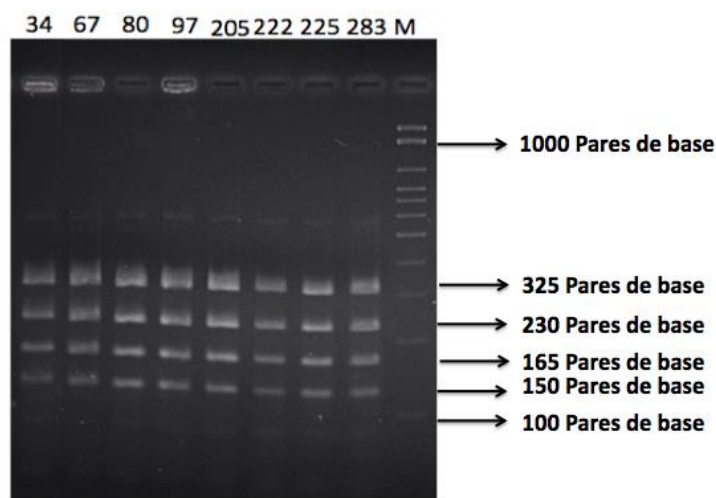
*M – Refere-se ao marcador molecular

FIGURA 12 - RESULTADO DA ELETROFORESE DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EMPREGANDO OS PRIMERS ITS 1 E ITS 4 PARA AS LEVEDURAS 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225 E 283.

FONTE: O Autor (2015)

Para realizar a confirmação de gênero e espécie destas leveduras foi necessário o emprego da enzima de restrição *HaeIII*. Segundo Guillamón *et al.* (1998), cada enzima apresenta um padrão de fragmentação característico. Esta enzima de restrição foi escolhida porque apresenta padrões distintos de fragmentação para *Saccharomyces cerevisiae* (320pb, 220pb, 180pb e 145pb), *Saccharomyces bayanus* (500pb, 220pb e 145pb) e *Saccharomyces pastorianus* (500pb, 220pb e 145pb) (GUILLAMÓN *et al.*, 1998). Por meio da clivagem do produto de PCR das leveduras 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225 e 283 com o emprego

da enzima de restrição ocorreu o aparecimento de quatro fragmentos (FIGURA 13) duas bandas entre 100 e 200 pares de base, com cerca de 150 e 165 pares de base, uma banda entre 200 e 300 pares de base, com aproximadamente 230 pares de base e uma banda entre 300 e 400 pares de base, de aproximadamente 325 pares de base.



*M- Refere-se ao marcador molecular

FIGURA 13 - RESULTADO DA ELETROFORESE DA RESTRIÇÃO COM ENZIMA *HaeIII* DO PRODUTO DA REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE EMPREGANDO PRIMERS ITS 1 E ITS 4

FONTE: O Autor (2015)

Para Fernandez-Espinar *et al.* (2000) os perfis de fragmentação gerados para as leveduras *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* são, respectivamente: 495, 230 e 125; 325, 230, 170 e 125; e 495, 230 e 125. Para Pham *et al.* (2011) os resultados da restrição empregando a enzima *HaeIII* são de 140, 180, 240 e 320 pares de base para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, valores similares a Guillamón *et al.* (1998) e ao encontrado neste trabalho.

Assim, foi possível verificar que as leveduras 34, 80, 97 e 283 que apresentaram valores de log score entre 1,8 e 2,0 e a levedura 222 que apresentava valor de log score de 1,783 também haviam sido corretamente

identificadas por espectrometria MALDI-TOF. As leveduras denominadas de 205 e 225 que não haviam sido identificadas por MALDI-TOF foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* por PCR-RFLP.

Linde *et al.* (2009) verificaram que as sequências de aminoácidos das enzimas β -frutofuranosidase das cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* ATCC MYA-131; ATCC 24202 e ATCC 24230 apresentavam diferenças de até 33 aminoácidos. Esta diferença levou a distinções na composição dos fruto-oligossacarídeos produzidos (trissacarídeos, tetrassacarídeos e pentassacarídeos) bem como na concentração produzida por estas cepas.

A identificação taxonômica das leveduras 34, 67, 80, 97, 205, 222, 225 e 283 como *Saccharomyces cerevisiae* leva a crer que para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* também possa haver diferenças genotípicas entre linhagens, já que foram verificadas diferentes condições ótimas de valor de pH e temperatura para a formação de fruto-oligossacarídeos pelas leveduras, diferentes concentrações de fruto-oligossacarídeos produzida e diferente composição de fruto-oligossacarídeos (trissacarídeos e tetrassacarídeos) sintetizada.

6. CONCLUSÃO

Das 141 leveduras avaliadas, 65 leveduras formaram oligossacarídeos. As condições estabelecidas para a cromatografia em camada delgada e para cromatografia em fase líquida de alta eficiência foram adequadas para a detecção dos trissacarídeos e a identificação e quantificação dos carboidratos formados.

Os parâmetros de reação, valores de pH 4,5, 5,5 e 6,5 nas temperaturas de 40 °C e 60 °C e valor de pH 4,5 para a temperatura de 50 °C exerceram influência significativa nas concentrações do trissacarídeo 1-cestose formadas pelas oito leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* por espectrometria de massa MALDI-TOF e por PCR-RFLP.

Nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, valor de pH 4,5, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* 80 e 225 formaram o trissacarídeo 1-cestose e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 222 formou 1-cestose e o tetrassacarídeo nistose em seis horas de reação.

REFERÊNCIAS

AGUSTINI, B. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. n. p. 1-10, 2014.

ÁLVAREZ-MARTÍN, P. *et al.* Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. **International Dairy Journal**. v. 17, n. p. 961-967, 2007.

ÁLVARO-BENITO, M. *et al.* Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **Journal of Biotechnology**. v. 132, n. 1, p. 75-81, 2007.

ÁLVARO-BENITO, M. *et al.* New Insights into the Fructosyltransferase Activity of *Schwanniomyces occidentalis* β -Fructofuranosidase, Emerging from Nonconventional Codon Usage and Directed Mutation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 22, p. 7491-7499, 2010.

ANDERSEN, B.; THIESEN, N.; BROE, P. E. The Transferring Activity of β -fructofuranosidase from Yeast: A Quantitative Description. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 23, n. p. 2367-2374, 1969.

ANTOSOVÁ, M.; POLAKOVIC, M. Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides. **Chemical Papers**. v. 55, n. 6, p. 350-358, 2001.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegações de Propriedades Funcional e/ou de Saúde.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 27/02/2015.

ARRIZON, J. *et al.* Fructanase and fructosyltransferase activity of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. **Bioresource Technology**. v. 110, n. 0, p. 560-565, 2012.

BENKEBLIA, N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. **Journal of Chromatography A**. v. 1313, n. 0, p. 54-61, 2013.

BERNARDI, T. L.; SILVA, G. A. D.; VALENTE, P. Considerações sobre a presença dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**. v. 3, n. p. 44-50, 2011.

CENDEJAS-BUENO, E. *et al.* Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 1895-1899, 2010.

CHEN, H.-M. *et al.* Product monitoring and quantitation of oligosaccharides composition in agar hydrolysates by precolumn labeling HPLC. **Talanta**. v. 64, n. 3, p. 773-777, 2004.

CHEN, W.-C. Medium improvement for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**. v. 33, n. 3, p. 267-271, 1998.

CHENG, J. W. S. *et al.* Modified Protocol for Yeast Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **American Journal of Microbiological Research**. v. 1, n. 4, p. 71-73, 2013.

COMBES, D.; MONSAN, P. Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of products and substrate inhibition. **Carbohydrate Research**. v. 117, n. 0, p. 215-228, 1983.

COMBES, D.; MONSAN, P.; MATHLOUTHI, M. Enzymic hydrolysis of sucrose. **Carbohydrate Research**. v. 93, n. 2, p. 312-316, 1981.

CRUZ, R. *et al.* Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**. v. 65, n. 1-2, p. 139-143, 1998.

CUMMINGS, J. H.; CHRISTIE, S.; COLE, T. J. A study of fructo oligosaccharides in the prevention of travellers' diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 15, n. 8, p. 1139-1145, 2001.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. Mass spectrometry in biodefense. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 43, n. 11, p. 1441-1457, 2008.

DHAKE, A. B.; PATIL, M. B. Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, n. p. 194-199, 2007.

DOMINGUEZ, A. *et al.* New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**. v. 89, n. 4, p. 1174-1179, 2012.

DORTA, C. *et al.* Sugarcane molasses and yeast powder used in the Fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 33, n. 12, p. 1003-1009, 2006.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal interna transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, n. p. 329-337, 1999.

FARINE, F. *et al.* Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 55, n. p. 55-60, 2001.

FERNANDEZ, R. C. *et al.* Production of fructooligosaccharides by Beta-fructofuranosidase from *Aspergillus* sp. 27H. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 79, n. p. 268-272, 2004.

FERNANDEZ, R. C. *et al.* Screening of beta-fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 75, n. 1, p. 87-93, 2007.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. *et al.* RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 78, n. 1, p. 87-97, 2000.

FIALHO, M. B. *et al.* Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. **Mycoscience**. v. 54, n. 3, p. 198-205, 2013.

FONTANA, J. D. *et al.* Fructo-Oligosaccharide Production from Inulin Through Partial Citric or Phosphoric Acid Hydrolyses. **Journal of Medicinal Food**. v. 14, n. 11, p. 1425-1430, 2011.

GAENSLY, F. **Aumento do teor de resvetratrol livre em vinhos empregandolinhas de leveduras vnicas autóctones com atividade Beta-glucosidásica**. f. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 20XX.

GANAIÉ, M.; LATEEF, A.; GUPTA, U. Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 172, n. 4, p. 2143-2159, 2014.

GANAIÉ, M. A.; DEHARYA, K.; GUPTA, U. S. Optimization of process parameters of biocatalyst for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 2, p. 4138-4148, 2013.

GANAIÉ, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 97, n. 0, p. 12-17, 2013.

GHAZI, I. *et al.* Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**. v. 128, n. 1, p. 204-211, 2007.

GIBSON, G. R. *et al.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. In. **Nutr Res Rev.** England, 2004. p. 259-75.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition.** v. 125, n. 6, p. 1401-12, 1995.

GRANCHI, L. *et al.* Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology.** v. 87, n. 6, p. 949-956, 1999.

GUILLAMÓN, J. M. *et al.* Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Arch Microbiol.** v. 169, n. 5, p. 387-392, 1998.

GUTIÉRREZ-ALONSO, P. *et al.* Biochemical characterization of a β -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. **Fems Yeast Research.** v. 9, n. 5, p. 768-773, 2009.

HIDAKA, H. *et al.* The Effects of Undigestible Fructooligosaccharides on Intestinal Microflora and Various Physiological Functions on Human Health. In: FURDA, I.; BRINE, C. **New Developments in Dietary Fiber:** Springer US, 1990. p. 105-117.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. E. A. **Biotecnologia Industrial - vol. 2. Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Blucher, 2001. p. 93 - 122.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

INTHANAVONG, L. **Production and Characterization of the Fructosyltransferase (Levansucrase) from *Geobacillus stearothermophilus* and its Application for the Synthesis of Novel Fructooligosaccharides.** 117 f. (Dissertação de Mestrado em Ciências) - Departamento de Ciências de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Montreal, 2011.

JAMES, S. A. *et al.* Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. **Genome Research**. v. 19, n. 4, p. 626-635, 2009.

JUNG, K. H. *et al.* Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 11, n. 8, p. 491-494, 1989.

KANGO, N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. **Journal of Food Engineering**. v. 85, n. 3, p. 473-478, 2008.

KHANDEKAR, D. *et al.* Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37, n. 12, p. 2529-2537, 2014.

KILIAN, S. G. *et al.* Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 8, p. 975-980, 1996.

KOWALSKA, T. Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography. In: SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of Thin-Layer Chromatography**. Londres: Taylor e Francis, 2003. p. 49 - 80.

KRIVOROTOVA, T.; SEREIKAITĖ, J. Seasonal changes of carbohydrates composition in the tubers of Jerusalem artichoke. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 36, n. 1, p. 79-83, 2014.

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hidrolisis by beta-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 45, n. p. 236-239, 1996.

LAOWKLOM, N.; CHANTANAPHAN, R.; PINPHANICHAKARN, P. Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Sterptomyces* sp. CP01. **Natural Resources**. v. 3, n. 3, p. 137-144, 2012.

LIM, J. *et al.* Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase. **European Food Research and Technology**. v. 225, n. 3-4, p. 457-462, 2007.

LIM, J. *et al.* Optimization of culture medium and conditions for Neo-fructooligosaccharides production by *Penicillium citrinum*. **European Food Research and Technology**. v. 221, n. 5, p. 639-644, 2005.

LINDE, D. *et al.* Molecular and Biochemical Characterization of a β -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 75, n. p. 1065-1073, 2009.

MACDONALD, A. *et al.* Specific prebiotics in a formula for infants with Phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 104, Supplement, n. 0, p. S55-S59, 2011.

MADLOVA, A. *et al.* Screening of Microorganisms for Transfructosylating Activity and Optimization of Biotransformation of Sucrose to Fructooligosaccharides. **Chemical Papers**. v. 53, n. p. 366-369, 1999.

MARKLEIN, G. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 9, p. 2912-2917, 2009.

MARX, S. P.; WINKLER, S.; HARTMEIER, W. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 182, n. 1, p. 163-169, 2000.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 49, n. 1–4, p. 43-49, 2007.

MITCHELL, J. I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. **Mycologist**. v. 20, n. p. 62-74, 2006.

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 16, n. 2-3, p. 187-192, 1995.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 59, n. 1-3, p. 76-81, 2009.

NASCIMENTO, R. F. D. *et al.* Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína. **Food Science and Technology (Campinas)**. v. 23, n. p. 217-221, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In: _____. **Lehninger - Principles of Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2011. p. 183 - 232.

NING, Y. *et al.* Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 19, p. 7472-7478, 2010.

NISHIZAWA, K.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H. Kinetic Study on Transfructosylation by β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and Availability of a Membrane Reactor for Fructooligosaccharide Production. **Food Science and Technology Research**. v. 7, n. 1, p. 39-44, 2001.

OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a New Sweetener, "Neosugar," in the Rat. **The Journal of Nutrition**. v. 114, n. 9, p. 1574-1581, 1984.

OTTONI, C. A. *et al.* Media optimization for Beta-Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 29, n. p. 49-59, 2012.

PALCIC, M. M. Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, n. 6, p. 616-624, 1999.

PARK, J.-P.; OH, T.-K.; YUN, J.-W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**. v. 37, n. 5, p. 471-476, 2001.

PARK, M. *et al.* Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**. v. 27, n. 2, p. 127-130, 2005.

PINTO, A. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. **PLoS ONE**. v. 6, n. 10, p. e25712, 2011.

QIAN, J. *et al.* MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Anal Bioanal Chem**. v. 392, n. 3, p. 439-449, 2008.

QUIGLEY, E. M. M. Therapies Aimed at the Gut Microbiota and Inflammation: Antibiotics, Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Anti-inflammatory Therapies. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 40, n. 1, p. 207-222, 2011.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**. v. 137, n. 3, p. 830S-837S, 2007.

SABATER-MOLINA, M. *et al.* Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 65, n. 3, p. 315-328, 2009.

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**. v. 40, n. 3-4, p. 1085-1088, 2005a.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005b.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**. v. 34, n. 8, p. 851-855, 1999.

SHEU, D.-C. *et al.* Production of high-purity neofructooligosaccharides by culture of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**. v. xx, n. xx, p. xx, 2013.

SILVA, G. A. D. *et al.* Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 55, n. p. 319-327, 2012.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and their Prebiotic Potential. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 4, p. 435-450, 2010.

STEVENSON, L. G. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 10, p. 3482-6, 2010.

STRAATHOF, A. J. J.; KIEBOOM, A. P. G.; BEKKUM, H. V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**. v. 146, n. p. 154-159, 1986.

SZAMBELAN, K.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. **Biotechnology Letters**. v. 26, n. 10, p. 845-848, 2004.

TIAN, F.; KARBOUNE, S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 82, n. 0, p. 71-79, 2012.

TOLEDO, L. E. T. *et al.* **Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast.** 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando micro-organismos através do microscópio. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012a. p. 54-75.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento Microbiano. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012b. p. 156-171.

VACCARI, G. *et al.* Detection of oligosaccharides in sugar products using planar chromatography. **Food Chemistry**. v. 74, n. 1, p. 99-110, 2001.

VAN DEN HEUVEL, E. G. H. M. *et al.* Short-chain fructo-oligosaccharides improve magnesium absorption in adolescent girls with a low calcium intake. **Nutrition Research**. v. 29, n. 4, p. 229-237, 2009.

VENEMA, J.; TOLLERVEY, D. RIBOSOME SYNTHESIS IN *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**. v. 33, n. 1, p. 261-311, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Enzimas. In. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: ArtMED, 2000. p. 281-349.

WAGNER, W.; WIEMKEN, A.; MATILE, P. Regulation of fructan metabolism in leaves of barked (Hordeum vulgare L. cv Gerbel). **Plant Physiology**. v. 81, n. 2, p. 444-447, 1986.

YANG, Y.-L. *et al.* Preparation of High-Purity Fructo-oligosaccharides by *Aspergillus japonicus* β -Fructofuranosidase and Successive Cultivation with Yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 8, p. 2805-2809, 2008.

YOSHIKAWA, J. *et al.* Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**. v. 30, n. 3, p. 535-539, 2008.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, n. 2, p. 107-117, 1996.