

VALÉRIA DA COSTA FRANCO

**EFEITO DE SUBSTRATOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS
NA PRODUÇÃO/SECREÇÃO DE INULINASES POR
MICROORGANISMOS.**

Tese aprovada como requisito parcial para
obtenção de grau de Mestre no curso de Pós-
graduação em Bioquímica pela Comissão
formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana
Prof. Dr. Marcello Iacomini
Prof.^a Dr.^a Momoyo Nakano

Curitiba, 18 de novembro de 1993.

Tese orientada pelo Professor Dr. José Domingos Fontana.

Aos meus pais, Waldyr (in memorium) e Regina e, ao meu esposo
Robinson, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA, pela orientação desta tese, pela compreensão e amizade.

Ao Professor Dr. PAULO C. VERTONI, do Departamento de Ciência e Tecnologia da ESALQ - USP de Piracicaba, pelas cepas de **Kluyveromyces marxianus** var. **marxianus** gentilmente cedidas.

Ao Professor M. J. DABDOU PAZ, do Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto, pelos espectros de infra-vermelho com transformação de Fourier (FTIR).

Aos Senhores J. P. GAVA e L. BERTGER, da Cia. de Cigarros Souza Cruz, pelos espectros de Ressonância Nuclear Magnética de ¹³C.

À desenhista SUELY RIBEIRO FRANCO, pelos desenhos constantes desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Quimiobiotecnologia de Biomassa, em especial à Mestre em Bioquímica IVONE NUNES LYRA, à Doutora MARIA CÉLIA O. HAULY, à Professora Dra. MADALENA BARON e aos amigos EDUARDO e NANCY, pelas sugestões, incentivo e amizade.

Às bibliotecárias RUTH, MARISA e TELMA pelos auxílios prestados com as referências bibliográficas.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação e a todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPR, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro fornecido durante o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
ABSTRACT	xiv
RESUMO	xv
INTRODUÇÃO	01
Objetivos:.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Fonte de Inulina.....	20
2. Coleta das raízes tuberosas de espécies híbridas de <u>Dahlia pinnata</u>	20
3. Extração de Inulina de raízes tuberosas de espécies híbridas de <u>Dahlia pinnata</u>	20
4. Tratamento de inulina com DEAE celulose - Cl ⁻	21
5. Síntese dos derivados de inulina.....	21
5.1. Reação de inulina com cloreto de caproíla.....	21
5.2. Reação de inulina com anidrido esteárico e com anidrido propiônico.....	23
5.3. Reação de inulina com cloreto de oleíla (C ₁₈ H ₃₅ Cl).....	25
5.4. Reação de inulina com cloreto de colesterila (C ₂₇ H ₄₅ Cl).....	27
6. Síntese do derivado de sacarose.....	29
7. Caracterização de inulina e seus derivados através de hidrólise ácida.....	29
8. Microorganismos.....	32

9.	Cultivo líquido dos microorganismos.....	33
10.	Determinação da atividade de inulinase EC 3.2.1.7 (2,1-β-D-frutana-frutana-hidrolase).....	34
11.	Métodos Gerais.....	34
12.	Métodos analíticos.....	35
12.1.	Carboidratos totais.....	35
12.2.	Carboidratos redutores.....	35
12.3.	Determinação de proteínas.....	35
12.4.	Análises cromatográficas.....	36
12.4.1.	Cromatografia em camada delgada	36
12.4.2.	Cromatografia em coluna de Biogel P-6.....	37
12.4.3.	Cromatografia líquida de alta resolução (H.P.L.C.).....	37
12.5.	Espectroscopia de infra-vermelho.....	37
12.6.	Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ¹³ C...38	
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1.	Raízes tuberosas de <u>Dahlia pinnata</u> como fonte de inulina.....	39
2.	Extração de inulina de raízes tuberosas de dália.....	41
3.	Purificação de inulina.....	42
4.	Síntese dos derivados de inulina.....	42
4.1.	Caproil-derivado.....	42
4.2.	Propionil e Estearil-derivados	46
4.3.	Oleil-derivados.....	46
4.4.	Colesteril-derivado.....	47
5.	Síntese do derivado de sacarose.....	47
6.	Caracterização de Inulina, Cp-In e Cl-In por Hidrólise Ácida.....	49
7.	Cultivo de Microorganismos Inulolíticos em inulina	

	nativa e nos substratos derivatizados.....	49
7.1.	Indução de inulinase em <u>Aspergillus niger</u>	51
7.2.	Indução de inulinase em <u>Kluyveromyces marxianus</u>	53
7.3.	Indução de inulinase em bactéria sp.....	60
8.	Cromatografia em coluna de Biogel P-6 de inulina, caproil-inulina e colesteril-inulina.....	61
9.	Espectroscopia de Infra-vermelho.....	61
10.	Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ¹³ C.....	62
	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	-	Adenosina monofosfato.
atm	-	Atmosfera.
CAC	-	Coluna para análise de carboidratos.
Cl-In	-	Colesteril-inulina.
Cp-In	-	Caproil-inulina.
ESALQ	-	Escola superior agrícola Luiz de Queiroz.
DEAE	-	Dietil-aminoetil.
DFA III	-	Di-D-frutofuranose 1,2':2,3' dianidrido.
DMF	-	Dimetilformamida.
DMSO	-	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d ₆	-	Dimetilsulfóxido deuterado.
DNS	-	Dinitrosalicilato.
dS	-	Sacarose derivatizada (Caproil-sacarose).
FDA	-	Food and Drug Administration.
FTIR	-	Espectroscopia de infra-vermelho com transformação de Fourier (Fourier transform infra-red spectroscopy).
HFCS	-	High fructose corn syrup.
HMF	-	Hidroximetilfurfural.
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance (High-performance liquid chromatography).
kDa	-	Quilo Dalton.
LQBB	-	Laboratório de quimiobiotecnologia de biomassa.
1-O-In	-	Oleil-inulina obtida pelo sistema 1.
2-O-In	-	Oleil-inulina obtida pelo sistema 2.
P-In	-	Propionil-inulina.

P.M.	-	Peso molecular.
P/V	-	Peso/volume.
RNA	-	Ácido ribonucleico.
R.N.M.	-	Ressonância nuclear magnética.
rpm	-	Rotações por minuto.
ppm	-	Partes por milhão.
S-In	-	Estearil-inulina.
TFA	-	Ácido trifluoroacético.
t.l.c.	-	Cromatografia em camada delgada (Thin layer chromatography).
U.V.	-	Ultra-violeta.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito de indutores modificados no rendimento de enzimas. (REESE, 1972).....17
- Tabela 2 - Efeito de substratos modificados quimicamente no rendimento de inulinase em Aspergillus niger.....52
- Tabela 3 - Efeito de inulinas modificadas quimicamente no rendimento de inulinase nos cultivos das leveduras selecionadas.....54

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Extração e purificação de inulina.....	22
Esquema 2 - Síntese de caproil-inulina (Cp-In).....	24
Esquema 3 - Síntese de estearil-inulina (S-In) e de propionil-inulina (P-In).....	26
Esquema 4 - Síntese dos oleil derivados de inulina (1-O-In e 2-O-In).....	28
Esquema 5 - Síntese de colesteril-inulina (Cl-In).....	30
Esquema 6 - Síntese de caproil-sacarose (dS).....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da Inulina.....	02
Figura 2 -	Estrutura do DFAIII.....	07
Figura 3 -	Síntese de HMF a partir de frutose em meio ácido..	12
Figura 4 -	Esquema de Operon lactose e seu gene regulador.....	14
Figura 5 -	Esquema do Operon lactose nos estados (A) reprimido e (B) induzido.....	14
Figura 6 -	Exemplares de espécies híbridas de <u>Dahlia pinnata</u>	40
Figura 7 -	Raízes tuberosas de espécies híbridas de <u>Dahlia pinnata</u>	40
Figura 8 -	Inulina de <u>Dahlia</u> antes e a pós purificação em camada de DEAE celulose-Cl ⁻	43
Figura 9 -	Configuração possível no estado de transição da acilação de fenóis por anidrido acético, catalisada por piridina. BONNER & HILLIER (1973).....	45
Figura 10 -	Cromatografia em camada delgada de: a) P-In e S-In, b) 1-O-In e 2-O-In, c) dS.....	48
Figura 11 -	Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados ácidos de inulina, Cp-In e Cl-In obtidos à 65°C em TFA pH 2,0.....	50
Figura 12 (a) -	Perfil de indução de inulinase na cepa IZ-275 de <u>Kluyveromyces marxianus</u>	55
Figura 12 (b) -	Perfil de indução de inulinase na cepa IZ-619 de <u>Kluyveromyces marxianus</u>	56
Figura 13 (a) -	Espectro de infra-vermelho com transformação de Fourier (FTIR) de inulina nativa purificada, obtida de tubérculos de <u>Dahlia</u>	63

Figura 13 (b) - Espectro de infra-vermelho com transformação de Fourier (FTIR) de Colesteril-inulina (Cl-In).....	64
Figura 14 (a) - Espectro de ^{13}C -R.N.M. de inulina nativa purificada, extraída de tubérculos de <u>Dahlia</u>	65
Figura 14 (b) - Espectro de ^{13}C -R.N.M. de Caproil-inulina (Cp-In)...	66

ABSTRACT

Inulin extracted from Dahlia pinnata tubers was purified by means of ethanol precipitation and ion-exchange on DEAE-celulose to remove pigments and acidic contaminants.

The highly purified inulin was submitted to several procedures of mild chemical derivatization in order to modify the original chemical structure through the insertion of lipophylic substituents.

Amongst the obtained derivatives, two revealed efficient induction of inulinases production/secretion of yeast (Kluyveromyces), mold (Aspergillus), and bacterium (a local inulinolytic isolate), namely, caproyl-inulin and cholesteryl-inulin. The respective chlorides were used as donors of lipophylic moieties and the catalysis was carried out in non-aqueous/alkaline media. Derivatizations were monitored by ¹³C-nmr (nuclear magnetic resonance) and FTIR (Fourier transform-infrared spectroscopy). Caproyl-inulin resulted in superior inulinase I (fructose release) induction in yeasts with an increase up to 8.3 times with respect to the control medium containing underivatized inulin (single carbon source). This derivative also positively affected the growth of the inulinolytic soil bacterium isolate as well as it shortened the respective onset for DFA III (difructose anhydride) release in the culture medium by inulinase II.

RESUMO

Inulina extraída de raízes tuberosas de *Dahlia pinnata*, após submetida a um tratamento com DEAE celulose - Cl⁻, foi obtida com alto grau de pureza para então sofrer diversos processos de derivatização química, com a finalidade de modificar estruturalmente a molécula nativa, pela inserção de grupamentos lipofílicos, esperando-se com isso incrementar a atividade de inulinase dos microorganismos-alvo quando na presença do substrato modificado. Os produtos de derivatização suave do polímero, que revelaram-se eficientes indutores da produção / secreção de inulinases por ***Aspergillus niger***, e também por duas cepas de ***Kluyveromyces marxianus*** var. ***marxianus*** foram: Caproil-inulina e Colesteril-inulina. Para as sínteses químicas destes derivados de inulina, foram utilizados como reagentes os cloretos de caproíla e de colesterila, respectivamente, em meio básico. As derivatizações foram monitoradas por espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética de ¹³C e de Infra-vermelho com transformação de Fourier, respectivamente. Caproil-inulina mostrou-se superior como indutor de inulinase de leveduras quando comparado ao colesteril-derivado, chegando a aumentar a produção da enzima em até 8,3 vezes em relação à quantidade obtida com inulina nativa como única fonte de carbono no meio de cultivo. A bioconversão bacteriana de inulina em DFA III, um di-D-frutose dianidrido, bem como também o crescimento celular, foram acelerados na presença do derivado lipofílico Caproil-inulina.

INTRODUÇÃO

A enzima inulinase hidrolisa o polímero de plantas inulina dando como produto final praticamente frutose pura. A inulina é um polímero de reserva de várias plantas, obtida inicialmente de tubérculos de alcachofra de Jerusalém (Helianthus tuberosus L.), também denominada de Tupinambo por McDONALD (1946), sendo também obtida de dente-de-leão (Taraxacum officinale Weber), chicória (Cichorium intybus L.) e dália (Dahlia pinnata Cav.), MUKHERJEE & SENGUPTA (1989). A inulina é uma frutana e, segundo GOODWIN & MERCER (1983), é um polímero de β -D-frutofuranoses mantidas por ligações glicosídicas β -D-(2->1), apresentando um resíduo de α -D-glucopiranosose unido por ligação α -1- β -2 à unidade de frutofuranose, formando uma unidade de sacarose numa das extremidades (figura 1). O comprimento médio da cadeia de inulina varia conforme a planta e a estação do ano, esta propriedade resultando provavelmente da ação da inulinase da própria planta. Teoricamente a inulina deve conter no mínimo 30 unidades de açúcar, ou seja, o grau de polimerização deve ser igual ou maior que 30, que corresponde a um peso molecular de 4900 à 5500. A inulina é insolúvel em água, e mesmo à 55°C é apenas parcialmente solúvel (5%), VANDAMME & DERYCKE (1983).

LINDNER observou em 1900 que a levedura Saccharomyces marxianus e algumas cepas não identificadas eram capazes de utilizar inulina. Tais observações foram também relatadas por GRAFE & VOUK (1913) e por KLUYVER (1914). Em 1933 SACCHETTI provou que a levedura Kluyveromyces fragilis crescia às custas de inulina. A primeira inulinase fúngica descrita foi a de Aspergillus niger em 1924 por

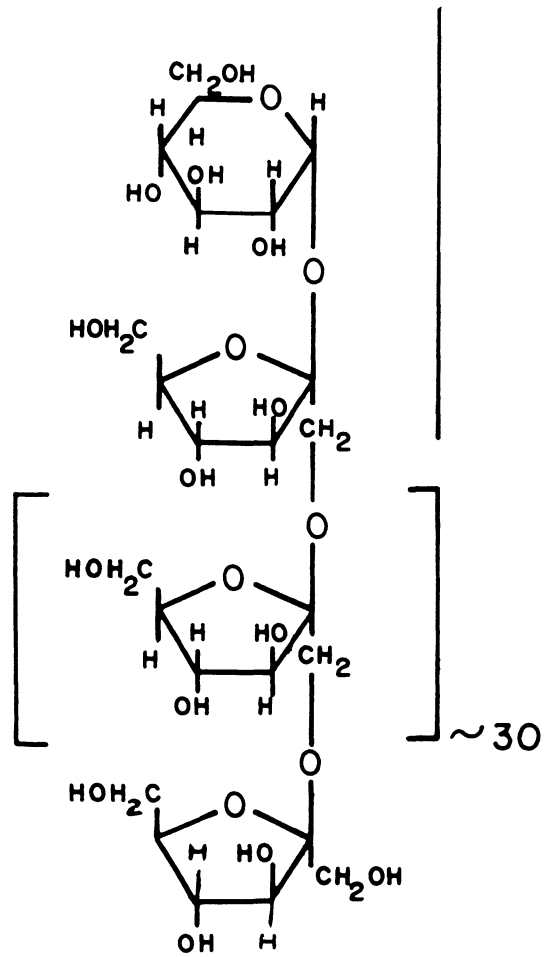


Figura 1 - Estrutura da inulina.

PRINGSHEIM & KOHN. Até 1943, no entanto acreditava-se que uma única enzima - a β -frutofuranosidase - era responsável pela hidrólise de sacarose, inulina, rafinose, irisina, gentianose e estaquiase. ADAMS et al.(1943) demonstraram a existência de uma inulinase verdadeira cuja atividade era diferente daquela da invertase. Desde então muitos microorganismos produtores de inulinase têm sido descritos.

As enzimas que degradam inulina, denominadas inulinases ou inulases, são encontradas em plantas e em microorganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A maioria das inulinases, segundo SNYDER & PHAFF (1962) e FUCHS et al. (1985), são de fato β -frutosidases não-específicas que atuam sobre as ligações β -2,1 e liberam moléculas de frutose a partir da extremidade não-redutora da inulina e de certos oligossacarídeos, podendo ser designadas como 2,1- β -D-frutana-frutanohidrolases (EC 3.2.1.7), diferentes das invertases que hidrolisam especificamente sacarose em glucose e frutose, classificadas como β -D-frutofuranosídeo-frutohidrolases (EC 3.2.1.26). Apesar da atividade hidrolítica destes dois grupos de enzimas sobre a sacarose ser equivalente, a inulinase se diferencia da invertase por que esta última apresenta baixa atividade com substratos de alto peso molecular como oligossacarídeos e frutanas do tipo inulina, segundo GROOTWASSINK & FLEMING (1980).

A razão S/I (razão das atividades relativas com sacarose e inulina como substratos) foi introduzida por SNYDER & PHAFF(1962) para discriminar invertase de inulinase. VANDAMME & DERYCKE(1983) consideram que uma razão S/I baixa, menor do que 50 (alta atividade com inulina), indica que a enzima é uma inulinase. A princípio, a classificação das inulinases era baseada na ocorrência de enzimas específicas em bactérias, fungos e plantas, que raramente demonstra-

vam atividade com sacarose, mas quebravam frutanas do tipo inulina agindo tanto como endo-enzimas como também como exo-enzimas, produzindo uma série de oligofrutanas ou somente frutose, respectivamente, EDELMAN & JEFFORD (1964) e SNYDER & PHAFF (1960). Por outro lado, FUCHS et al. (1985) e MUKHERJEE & SENGUPTA (1989) descobriram leveduras que produzem inulinases capazes de hidrolisar frutanas do tipo inulina e levana agindo como exo-enzimas é também capazes de hidrolisar sacarose. As diferenças nas razões S/I e nas constantes cinéticas foram consideradas insuficientes por alguns autores para a distinção entre inulinase e invertase em leveduras. Para estes autores, como KOVALJOVA & YURKEVICH (1978), ARNOLD (1987) e ROUWENHORST et al.(1988), a inulinase poderia ser um tipo especial de invertase e deveria ser classificada como tal.

WHITE & KENNEDY (1988) incluíram as enzimas capazes de atuar sobre inulina, levana e também sacarose, por remoção de grupos β -D-frutofuranosil terminais, na classe das exo β -D-frutosidases (β -D-frutana-frutanahidrolases (EC 3.2.1.80). No entanto, a diferença entre estas enzimas e as invertases (EC 3.2.1.26) não estava clara para as enzimas microbianas conforme discutido por ETTALIBI & BARATTI (1987) e MUKHERJEE & SENGUPTA (1989).

Em 1990 ROUWENHORST et al., pesquisando uma cepa de K. marxianus determinaram, através de parâmetros cinéticos e estruturais, que nas leveduras existiam duas β -frutosidases distintas: invertase e inulinase. Esta diferenciação adquiriu contornos mais precisos por estar baseada em base molecular, qual seja, a estrutura (glico) proteica das entidades enzimáticas. A inulinase que é secretada para o meio de cultura, tem uma massa molecular de aproximadamente 165 kDa, contém duas subunidades proteicas e 34% de carboidrato. A

inulinase associada à parede celular tem o mesmo conteúdo de carboidrato, mas é um tetrâmero com massa de 350kDa. Em Saccharomyces cerevisiae a invertase que é secretada ao meio de cultivo é um dímero com massa de 270kDa, enquanto que a enzima retida na parede celular é um octâmero de cerca de 800kDa. Ambas as formas de invertase contêm até 50% de carboidrato, ESMON et al. (1987). Além disso, pouca homologia foi encontrada nas sequências de aminoácidos das extremidades amino-terminais de invertase e inulinase, ROUWENHORST et al. (1990 a). As inulinasas foram isoladas inicialmente de tubérculos de alcachofra de Jerusalém por EDELMAN & JEFFORD (1964), de raízes de chicória por FLOOD et al. (1967) e de dente-de-leão por RUTHERFORD & DEACON (1972). As inulinasas de plantas, principalmente as oriundas das famílias Compositae, Liliaceae e Iridaceae, aparecem em níveis muito baixos e não apresentam atividade de invertase. Por outro lado, muitas inulinasas microbianas purificadas possuem uma notável atividade de invertase, VANDAMME & DERYCKE (1983).

Os estudos fundamentais sobre as inulinasas microbianas foram realizados principalmente no Japão e Coréia do Sul por KIM (1975) e ISHIBASHI et al. (1974), no Canadá por GROOTWASSINK & FLEMING (1980) e DUVNJAK et al. (1981), e na França por DEMEULLE et al. (1981) e GUIRAUD et al. (1982). Estudos sobre a produção, purificação e caracterização de inulinasas de diversos microorganismos foram relatados em detalhe há cerca de apenas uma década.

As inulinasas estão presentes em fungos, principalmente em Aspergillus niger pesquisado por NAKAMURA et al. (1978 a,b,c) e por AZHARI et al. (1989), e em Penicillium sp. estudado por NAKAMURA & NAKATSU em 1978. A enzima extra celular de A. niger atua sobre

inulina liberando inulotriose, inulotetraose e inulopentaose. Não hidrolisa sacarose e rafinose, podendo então ser classificada como endo-enzima. É também denominada de inulinase III, NAKAMURA et al. (1978 b).

Entre as bactérias produtoras de inulinase citam-se Lactobacillus plantarum pesquisado por TAKAHASI & SOUTOME (1975) e Arthrobacter ureafaciens descrito por TANAKA et al. (1972) e por UCHIYAMA et al. (1973). A inulinase de A. ureafaciens hidrolisa a inulina em di-D-frutofuranose-1,2':2.3' dianidrido (DFA III) e pequena quantidade de outros oligossacarídeos. É específica para compostos contendo ligações do tipo β -(2->1) e tem sido denominada de inulinase II, TANAKA et al. (1972). Segundo UCHIYAMA et al. (1973), esta enzima atua sobre inulina liberando DFA III por uma reação de transfrutossilacção intramolecular. A estrutura do DFA III pode ser vista na figura 2.

As inulinases são encontradas em leveduras, entre outras destacam-se as de Kluyveromyces fragilis amplamente estudadas por SNYDER & PHAFF (1960), BYUN & NAHM (1977), GROOTWASSINK & FLEMING (1980), GROOTWASSINK & HEWITT (1983), HEWITT & GROOTWASSINK (1984), WORKMAN & DAY (1983 e 1984), LAM & GROOTWASSINK (1985), MANZONI & CAVAZZONI (1988) e NEGORO (1978); de Kluyveromyces marxianus pesquisadas por PAREKH & MARGARITIS (1985), ROUWENHORST & VAN DIJKEN (1988,1990,1991); de Candida kefyr estudadas por NEGORO & KITO (1973 a,b); e de Debaromyces canterellii descritas por BELUCHE et al. (1980).

As inulinases de leveduras são exo-inulinases do tipo I, as quais produzem frutose livre, diferentemente das dos tipos III e II que produzem respectivamente inulinóligossacarídeos redutores e inulobiose

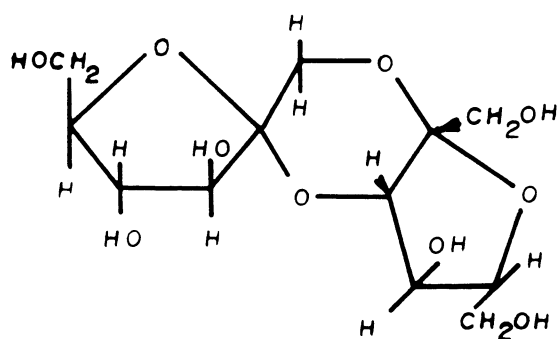


Figura 2 - Estrutura do DFA III.

desidratada, esta última não-redutora.

Dentre os numerosos microorganismos produtores de inulinase conhecidos, as leveduras parecem ser a melhor opção de escolha para uso em processos comerciais, principalmente as do gênero Kluyveromyces. Cepas de K. fragilis foram utilizadas por GROOTWASSINK & FLEMING (1980) no desenvolvimento de um processo laboratorial para produção de inulinase de elevada qualidade industrial. A vantagem desta espécie é que seu uso em alimentos é aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, assim sendo, suas enzimas também devem ser aceitas para aplicação em sistemas de alimentos. ROUWENHORST et al. (1988) estudaram a otimização da produção de inulinases por leveduras, e verificaram que uma cepa de K. marxianus apresentou propriedades superiores às observadas em outras cepas de Kluyveromyces. Além de apresentar maior especificidade pelo substrato e maior produção de inulinase, esta cepa de K. marxianus é termotolerante, crescendo em temperaturas de 40 a 45°C (maior produção da enzima entre 37 e 42°C), propriedade esta muito vantajosa em processos de escala industrial.

As frutanas são boas fontes de adoçantes naturais de baixa caloria, xaropes de alto teor de frutose e/ou di-D-frutose dianidridos (DFA). GROOTWASSINK & FLEMING (1980) relataram dados de tempos, rendimentos e outros que favorecem a hidrólise enzimática da inulina em relação à ácida para obtenção de frutose. Na hidrólise ácida, segundo FEATHER (1977), ocorrem reações secundárias indesejáveis, como o excessivo escurecimento causado pela caramelização dos açúcares e reação de Maillard com proteínas, provocando o aparecimento de sabores e odores desagradáveis. Entretanto, HAULY & FONTANA (1992) obtiveram por termopressurização direta (3atm;

144°C) de inulina em ácido ortofosfórico aquoso (concentração < 0,1%), xaropes de frutose levemente coloridos, isentos de sabores indesejáveis, contendo cerca de 3% de DFA III (di-D-frutofuranose 1,2':2,3' dianidrido) é praticamente livres de hidroximetilfurfural. Verificaram porém, em estudos de perfusão em fígado de rato, que o DFA III induz alterações no metabolismo de carboidratos.

A produção convencional de frutose a partir do amido necessita de pelo menos três passos enzimáticos, incluindo a ação de α -amilase, amilogucosidase e glucose isomerase, rendendo no máximo soluções com 45% de frutose. A partir de inulina, no entanto, basta uma única reação enzimática (inulinase) e os rendimentos atingem até 95% de frutose, VANDAMME & DERYCKE (1983).

Para a aplicação industrial da hidrólise enzimática, a enzima requerida deve estar disponível em grandes quantidades e com preço competitivo para que o processo seja viável. Têm sido pesquisadas técnicas de imobilização da atividade enzimática de inulinase através tanto da imobilização de enzimas purificadas como também de células microbianas. KIM & BYUN (1982) demonstraram a ocorrência da conversão de 90% de inulina (solução a 7%) para frutose, utilizando-se inulinase (EC 3.2.1.7) de Kluyveromyces fragilis imobilizadas em 2-amino-etil-celulose.

WORKMAN (1984) obteve bons resultados na obtenção de xarope de frutose a partir de inulina, utilizando células de K. fragilis imobilizadas pelo tratamento com glutaraldeído, as quais mostraram-se resistentes à destruição física e enzimática e portanto adequadas para uso em reator. BAJPAI & MARGARITIS (1986) obtiveram xaropes de frutose a partir de inulina de alcachofra de Jerusalém (15%), usando altas concentrações de células da levedura K. marxianus imobilizadas

em alginato de cálcio na concentração de 1,4%.

O interesse na produção em escala industrial de xaropes de frutose está baseado no fato de a frutose ser provavelmente o açúcar de ocorrência natural mais doce, HALLFRISCH (1990). Em relação à sacarose, o açúcar comumente empregado, a frutose apresenta poder edulcorante 1,5 vezes maior; menor capacidade de cristalização; propriedades coligativas que favorecem a redução do ponto de congelamento e o aumento da pressão osmótica; poder redutor que em condições controladas permite a participação em reações de escurecimento, e poder de sinergismo com outros adoçantes; características estas recomendadas para aplicação na indústria de alimentos. Apresenta ainda a vantagem de ser encontrada em abundância na natureza, tanto na forma livre (em frutas, em vegetais, mel) como combinada (frutanas), WHITE & PARKE (1989), PAREKH & MARGARITIS (1986 b), JOHNSON et al. (1989) e ZITTAN (1981).

É importante ressaltar que na preparação de xaropes ricos em frutose destinados ao consumo humano, deve-se considerar, além dos aspectos técnicos e econômicos, as características do produto final, que deve apresentar aparência, sabor e odor agradáveis e estar isento de substâncias que possam apresentar toxicidade no organismo. A frutose, em meio ácido e sob influência da temperatura, pode sofrer degradação e gerar compostos como o 5- (hidroximetilfurfural)-2-furaldeído e 2-(2-hidroxiacetil)-furano. Segundo SHAW et al. (1967), estes produtos de degradação da frutose resultam principalmente de reações de enolização e desidratação.

O consumo de frutose nos Estados Unidos, na forma de xarope com alto teor de frutose (HFCS), tem aumentado muito nos últimos anos e, projeções para o ano 2005 indicam este monossacarídeo como o principal adoçante a ser consumido, seguido de adoçantes sintéticos de

alta intensidade (como aspartame, etc.) e, em último lugar, a sacarose, FUCHS (1987).

Além do seu uso em alimentos, a frutose encontra aplicação também na indústria química para obtenção de compostos importantes como manitol, glicerol, etanol e hidroximetilfurfural, o último sendo precursor de compostos com atividade antifúngica, antibacteriana e herbicida, FUCHS (1987). LUGT et al. (1991) estudaram a aplicação de HMF na indústria de detergentes e cristais líquidos e DOUWSTRA (1991) comunicou a possibilidade de sua aplicação na síntese de cristais líquidos e também como precursor de polímeros rígidos. A síntese de 5-(Hidroximetil)-2-furaldeído (HMF) a partir de frutose em meio ácido, por reações de enolização e desidratação, segundo SHAW et al. (1967), pode ser vista na figura 3.

A utilização industrial de inulina requer microorganismos que tenham alta atividade de inulinase e que não estejam sob controle repressivo. Dos estudos de SNYDER & PHAFF (1960), NEGORO & KITO (1973), BELUCHE et al. (1980) e GROOTWASSINK & HEWITT (1983) sobre a regulação da síntese de inulinase em leveduras, concluiu-se que a enzima é indutível e sujeita à repressão catabólica. Para que a expressão da enzima seja máxima, deve ocorrer o equilíbrio entre os dois mecanismos regulatórios, indução e repressão catabólica, DEMAIN (1972) e REESE (1972).

JACOB & MONOD (1961) propuseram o modelo operon para explicar a regulação da síntese de proteínas, especificamente o lac-operon, regulador da síntese de B-galactosidase, galactosídeo permease e tiogalactosídeo transacetilase em Escherichia coli. Os elementos genéticos do modelo são um gen regulador, um sítio operador e uma série de genes estruturais (figura 4). O gen regulador codifica uma proteína

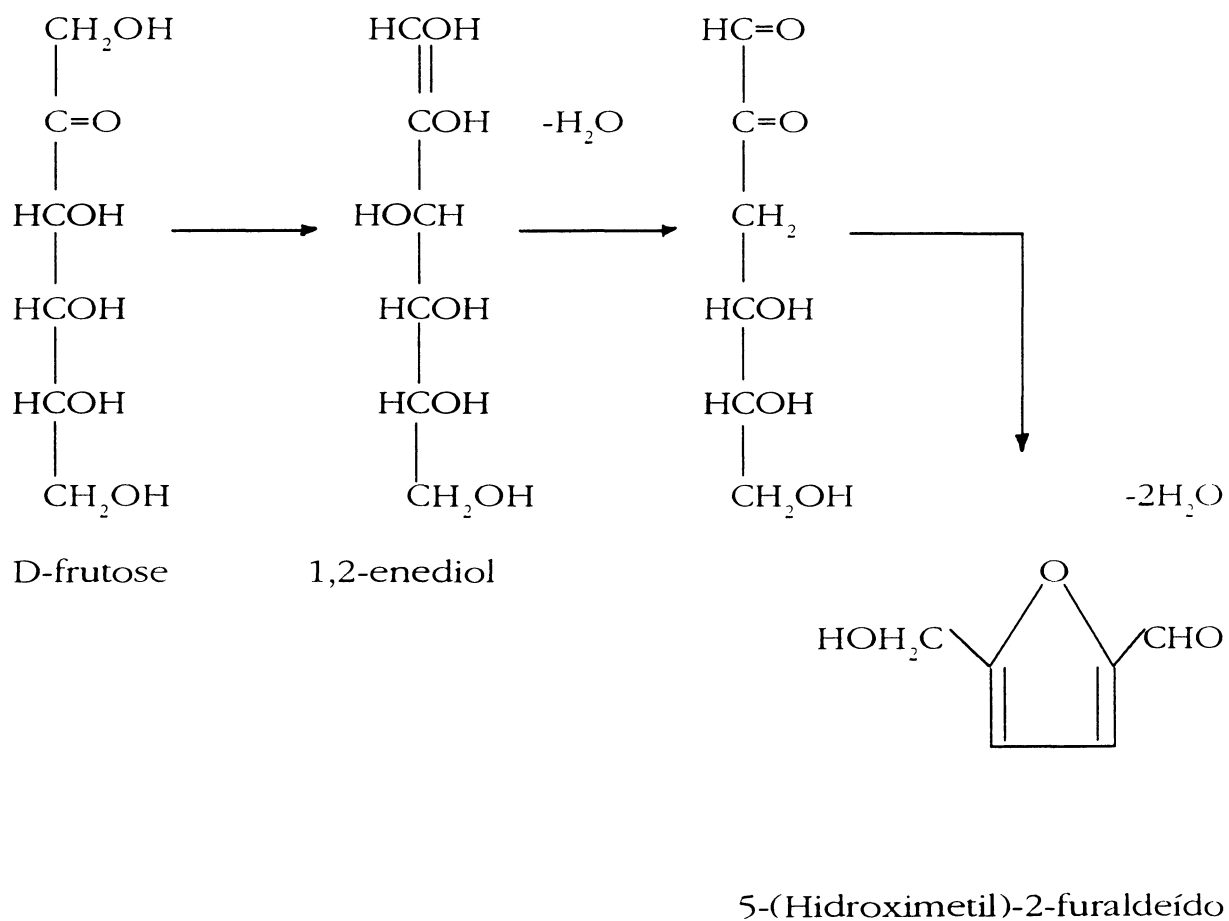


Figura 3 - Síntese de HMF a partir de frutose em meio ácido.

repressora capaz de interagir com o sítio operador, impedindo assim a transcrição dos genes estruturais pela RNA polimerase. Normalmente a produção de enzimas está nesta situação, reprimida, ou seja, os genes estruturais que codificam a produção das enzimas estão inativos (figura 5 a). Esta situação só é revertida na presença de um indutor adequado, o qual liga-se à proteína repressora inativando-a. Desbloqueia-se assim o sítio operador, possibilitando à RNA polimerase transcrever os genes estruturais que codificam as enzimas. O sistema está induzido (figura 5 b).

Outro fator importante a considerar na produção de enzimas é a já citada repressão catabólica também denominada como “efeito da glucose”, MAGASANIK (1961). DE CROMBRUGGHE et al. (1969) estudando a regulação da síntese de enzimas indutíveis em Escherichia coli, verificaram que o “efeito da glucose” era o de abaixar a concentração de AMP cíclico. Estudos bioquímicos e genéticos subsequentes revelaram que a presença de AMP cíclico estimulava a iniciação da transcrição de muitos operons indutíveis, ao ligar-se a uma proteína ativadora, denominada CAP. O complexo CAP-AMPc liga-se ao DNA e cria um sítio de interação adicional para a RNA polimerase, favorecendo assim a transcrição dos genes, DE CROMBRUGGHE et al. (1984).

A repressão catabólica causada pela queda na concentração de AMP cíclico, pode ser evitada através da não utilização de fontes de carbono repressoras no meio de cultivo. Por exemplo, WELKER & CAMPBELL (1963) verificaram que o crescimento de Bacillus stearothermophilus em glicerol ao invés de frutose aumenta a produção de α -amilase extracelular em 25 vezes. YAMANE et al. (1970) utilizaram manose ao invés de galactose para produção de celulase por Pseudomonas fluorescens var. cellulosa e obtiveram um rendimento 1500 vezes maior.

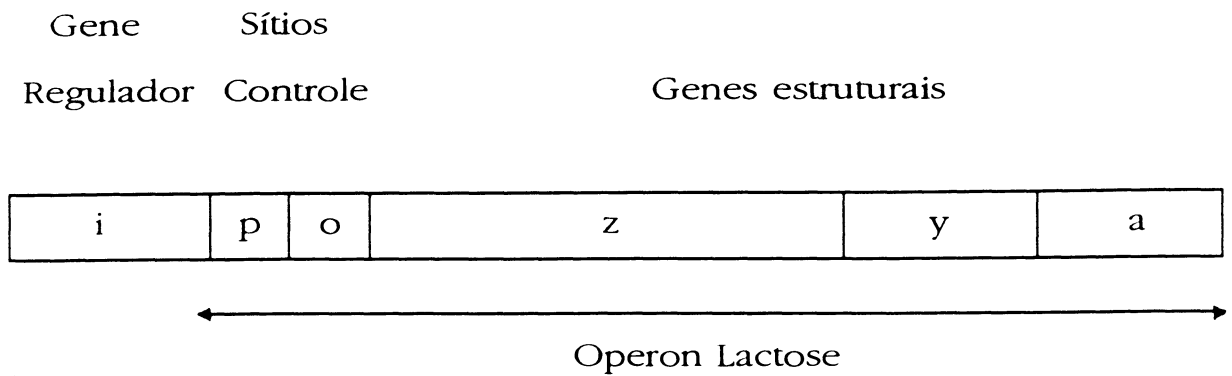


Figura 4 - Esquema do Operon Lactose e seu gene regulador.

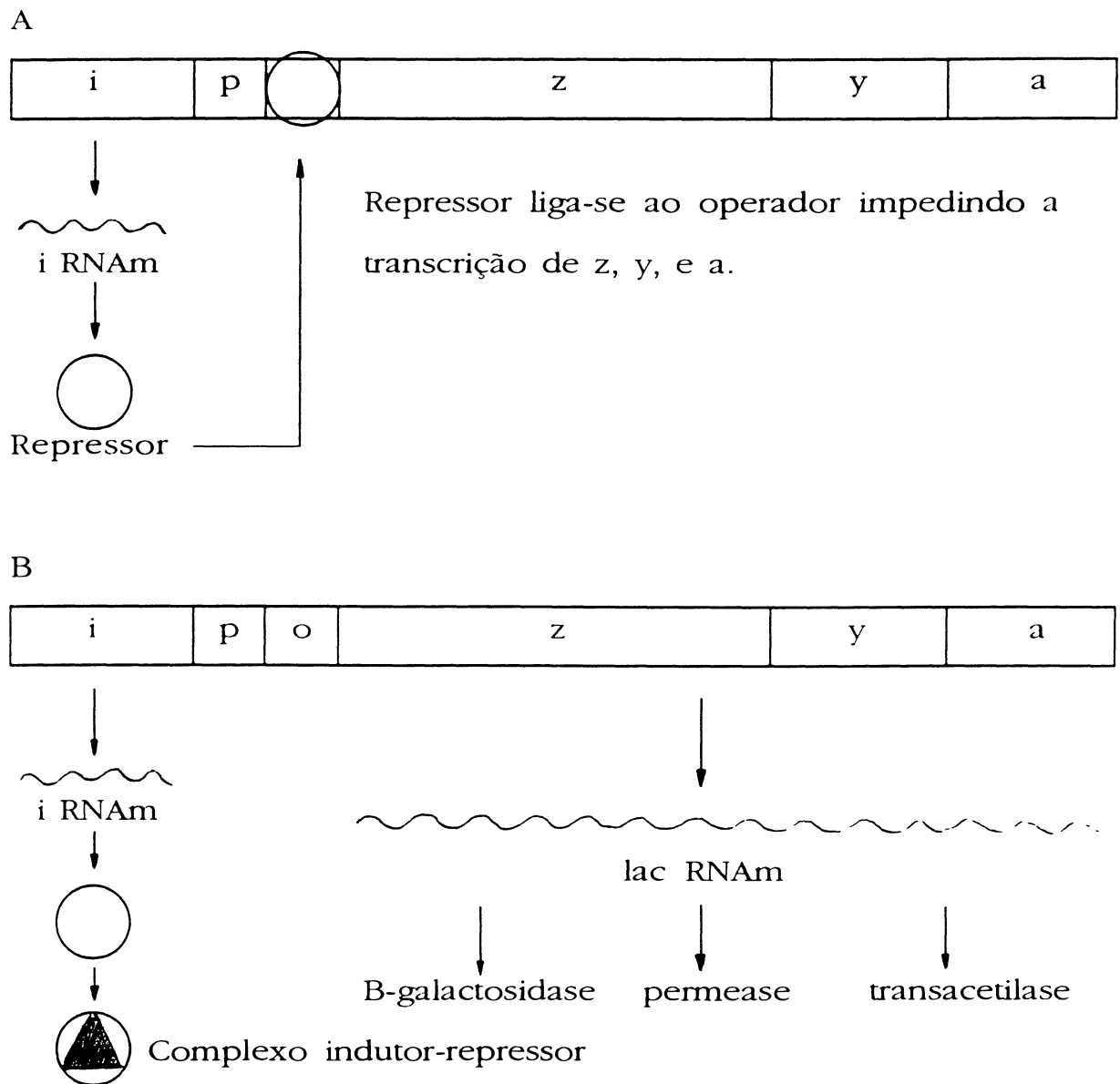


Figura 5 - Esquema do Operon lactose nos estados (A) reprimido e (B) induzido.

Um alto nível de expressão de enzimas requer, portanto, a presença simultânea de AMP cíclico e de um indutor específico.

Uma distinção deve ser feita entre um indutor fisiológico e um indutor molecular agindo ao nível do gene. Um indutor fisiológico pode ser o substrato de crescimento do microorganismo, ou um seu produto de quebra enzimática, como no caso dos substratos poliméricos. Um indutor molecular é sempre um derivado metabólico do indutor fisiológico. Análogos sintéticos não-metabolizáveis também podem ser funcionais como indutores moleculares, REESE (1972).

São muito poucos os casos em que os indutores moleculares naturais foram identificados. O exemplo clássico é a alolactose derivada da lactose na indução de B-galactosidase em *E. coli*, BARKLEY et al. (1975). STERNBERG & MANDELS (1979) verificaram que a indução de celulase em *Trichoderma reesei* parece ser mediada pela sofrorose obtida a partir da celobiose que, por sua vez, é um produto da hidrólise da celulose.

GROOTWASSINK & HEWITT (1983) estudaram a produção de inulinase por *Kluyveromyces fragilis* ATCC 12424 (levedura classificada atualmente como *K. marxianus* var. *marxianus*, ROUWENHORST et al. 1988) em cultura contínua com limitação de fonte de carbono e identificaram a frutose como o indutor fisiológico primário da inulinase.

ROUWENHORST et al. (1988) verificaram porém, que os melhores rendimentos foram obtidos utilizando-se inulina ou sacarose como substratos limitantes, ao invés de frutose. Observaram também que uma concentração mais elevada de sacarose no meio, resultou num aumento na concentração de açúcar residual, acompanhada de um decréscimo na atividade de inulinase. Além disso, os autores relataram que altas atividades enzimáticas ocorreram na presença de substratos não

açucarados. Estes dados indicam que a síntese de inulinase é regulada por repressão catabólica, em contradição à natureza indutível da enzima sugerida por GROOTWASSINK & HEWITT (1983).

Quando o catabolismo do substrato é muito rápido, com conseqüente acúmulo de açúcares residuais no meio, ocorre a repressão catabólica da produção de enzima. Nestes casos, a produção de enzima pode ser aumentada através da utilização de um substrato análogo que seja lentamente metabolizado, DEMAIN (1972).

Segundo REESE (1972), a repressão não é um problema da concentração de catabólitos, mas da velocidade com que o substrato é metabolizado. Segundo o autor, qualquer método que permita o lento fornecimento do substrato ao microorganismo, reduz a repressão catabólica, resultando no aumento de produção da enzima. Através do uso de ésteres do substrato, alguns autores têm obtido bons resultados neste sentido.

REESE & MAGUIRE (1971 a) verificaram em Aureobasidium pullulans, que o uso de sacarose monopalmitato ao invés de sacarose, aumentou em 100 vezes a produção de invertase. REESE et al. (1969) utilizaram dipalmitato de isomaltose e conseguiram aumentar a produção de dextranase tanto em relação à obtida com isomaltose como com dextrana, nos fungos testados.

Na tabela 1 encontram-se alguns registros do efeito de substratos modificados na produção de celulase (EC 3.2.1.4), dextranase (EC 3.2.1.11) e invertase (EC 3.2.1.26), REESE (1972).

Ao trabalharem com substratos modificados, REESE & MAGUIRE (1969 e 1971 b) perceberam que nem sempre o aumento da produção de enzima podia ser atribuído à lenta metabolização do substrato. Isto por que compostos como a sacarose monopalmitato, por exemplo, aumenta-

Tabela 1 - Efeito de indutores modificados no rendimento de enzimas. (REESE, 1972)

Enzima	Microorganismo	Indutor	Rendimento
Celulase EC 3.2.1.4	<u>Trichoderma viride</u>	Celulose	22,5 ^a
		celobiose	0,2 ^a
		celobiose dipalmitato	4,8 ^a
	<u>Pestalotiopsis westerdijkii</u>	celulose	35,9 ^a
		celobiose	0,2 ^a
		celobiose octaacetato	20,1 ^a
Dextranase EC 3.2.1.11	<u>Penicillium funiculosum</u>	dextrana	1.080,0 ^a
		isomaltose	2,0 ^a
		isomaltose dipalmitato	1.098,0 ^a
	<u>Penicillium lilacinum</u>	dextrana	46,9
		isomaltose	
		dipalmitato	102,5
Invertase EC 3.2.1.26	<u>Pullularia pullulans</u>	sacarose	1,3 ^a
		sacarose monopalmitato	108,0 ^a

a - valores em Unidades Internacionais. Os outros valores foram definidos pelos autores.

ram a síntese de β -galactosidase. Os autores sugeriram então, que um segundo fator, o efeito de surfactante na parede celular, estava envolvido. Surfactantes são substâncias que acumulam em interfaces. Sua incorporação à membrana celular altera a permeabilidade desta, podendo então facilitar a produção ou a secreção de enzimas microbianas, ou ambos, já que esta alteração é refletida no metabolismo do microorganismo.

Com a alteração do caráter polar de substratos e/ou indutores de natureza glicídica pela inserção de substituintes apolares, espera-se beneficiar o seu transporte até o domínio de membrana e/ou melhorar sua solubilidade a fim de afetar positivamente a produção e/ou secreção da enzima.

Objetivos:**Geral:**

Incremento da atividade de inulinase de microorganismos inulolíticos, modulado por modificação estrutural, de ordem lipofílica, do substrato nativo.

Específicos:

a) Extração e purificação de inulina a partir de raízes tuberosas de Dahlia pinnata.

b) Síntese de um caproil-derivado de inulina, ou seja, introdução de um ácido graxo de média cadeia (C6) na molécula nativa de inulina.

c) Síntese de um propionil-derivado de inulina pela introdução na molécula nativa do ácido graxo de cadeia curta (C-3).

d) Síntese de estearil e oleil derivados de inulina, introduzindo-se na molécula nativa os respectivos ácidos graxos de cadeia longa (C-18).

e) Síntese de colesteril-derivado de inulina pela introdução na molécula nativa da molécula apolar polinuclear de ciclopentano peridrofenantreno (C-27).

f) Avaliação do efeito dos derivados sintetizados na produção/secreção de inulinases de microorganismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Fonte de Inulina

Raízes tuberosas de espécies híbridas de Dahlia pinnata, também denominadas genericamente como dalias.

2. Coleta das raízes tuberosas de espécies híbridas de Dahlia pinnata

No final do mês de março de 1992, durante o outono, foram coletadas as raízes tuberosas de dalias, de um canteiro mantido nas adjacências do Departamento de Bioquímica da UFPr. desde 1988.

3. Extração de Inulina de raízes tuberosas de espécies híbridas de Dahlia pinnata

A inulina foi extraída segundo a técnica idealizada por FONTANA e descrita por HAULY (1991), com pequenas modificações.

As raízes tuberosas foram lavadas, descascadas e cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm³ e misturadas com uma solução tampão de fosfato de sódio de pH 6,5, à temperatura de 70 a 80°C, na proporção 1:1 (p/v). A mistura foi homogeneizada em porções, no liquidificador durante 2 minutos, e os homogenatos foram reunidos em um copo de Becker grande, mantendo-se aquecidos. O homogenato foi filtrado à quente através de um tecido do tipo musselina. O filtrado foi resfriado à 4°C por 24 horas, sendo então centrifugado à 3.000 g por

15 minutos para complementar a precipitação da inulina. Ao sobrenadante acrescentou-se 3 volumes de etanol absoluto p.a. para precipitar a inulina restante. Os precipitados foram reunidos e lavados 3 vezes com 2 volumes de etanol absoluto p.a., e 1 vez com 2 volumes de acetona, sendo a seguir liofilizados.

4. Tratamento de inulina com DEAE celulose - Cl⁻

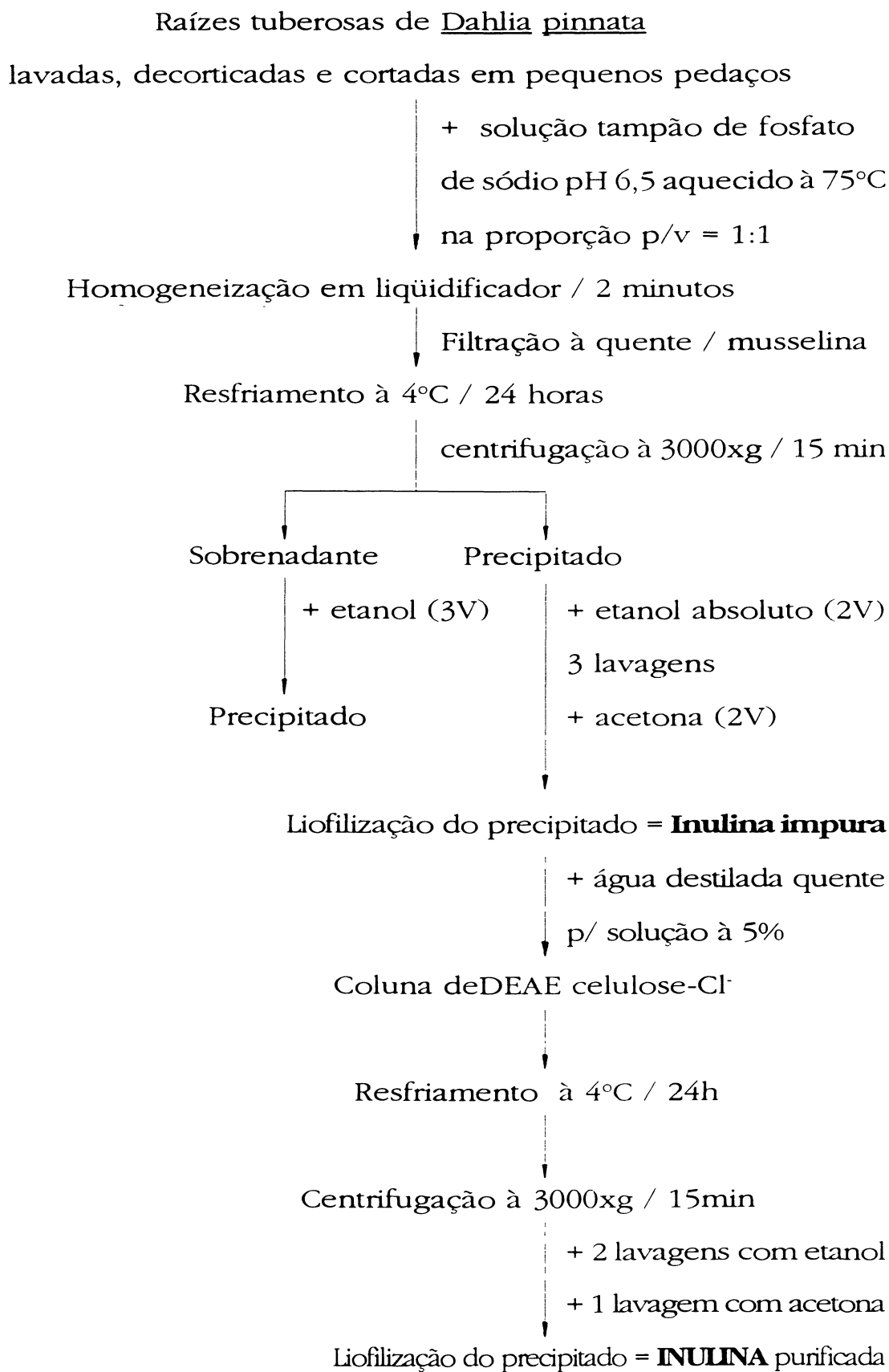
A inulina de dália liofilizada foi diluída em água destilada quente, na concentração de 5%, e esta solução foi percolada em camada de DEAE celulose - Cl⁻ em operação rápida. A solução assim obtida foi mantida à 4°C por 24 horas e centrifugada à 3.000 g por 15 minutos para precipitação da inulina. O precipitado foi lavado 2 vezes com 2 volumes de etanol absoluto p.a., e 1 vez com 2 volumes de acetona, sendo então liofilizado.

Estes tratamentos estão resumidos no esquema 1.

5. Síntese dos derivados de inulina

5.1. Reação de inulina com cloreto de caproíla

A proporção empregada de cloreto de caproíla ($C_6H_{11}OCl$, P.M. = 134,6g) em relação à inulina, definida aqui quimicamente como anidro frutose ($C_6H_{11}O_5$, P.M. = 162g) foi de 1:1 (mol). A princípio, diluiu-se 6g (correspondente à 37mM de anidro frutose) de inulina liofilizada em 36ml de dimetilsulfóxido (DMSO), adicionando-se então 64ml de piridina anidra. Esta solução à 6% de inulina foi mantida em banho de gelo, acrescentou-se 1,1g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e



Esquema 1 - Extração e purificação de inulina.

em seguida 5,1ml de cloreto de caproíla (correspondente à 37mM deste reagente de densidade 0,9805). A reação procedeu-se em balão de fundo redondo, com bolinhas de vidro para melhorar a agitação, sob vácuo em rotaevaporador, à temperatura de 5-8°C por 30 minutos.

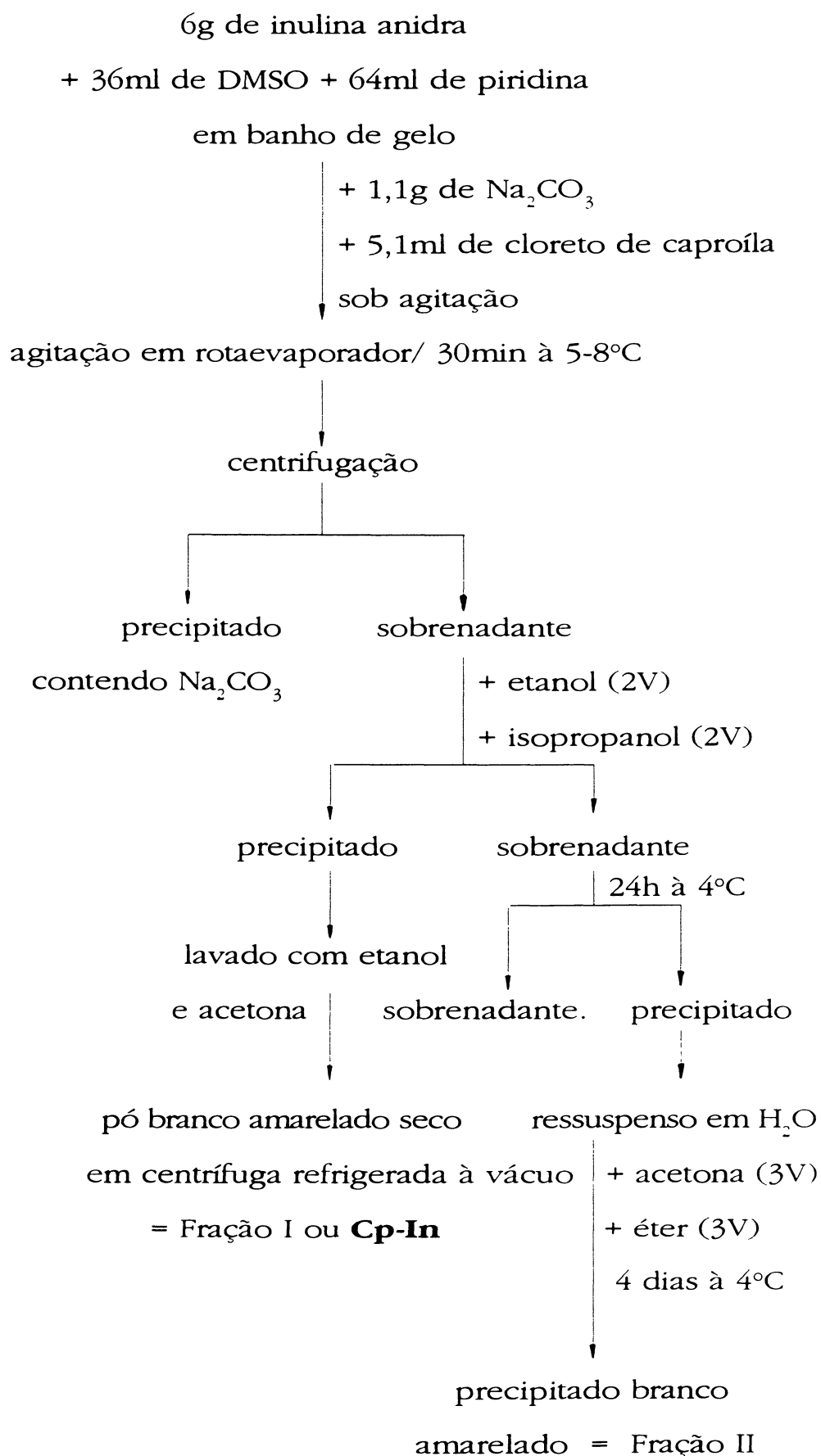
O meio de reação foi centrifugado para remover o Na_2CO_3 e o NaCl resultante. Ao sobrenadante adicionou-se 2 volumes de etanol e 2 volumes de isopropanol para precipitar o produto, o qual foi lavado com etanol e acetona, e seco sob vácuo (fração I ou Cp- In). O sobrenadante da fração I foi mantido à 4°C por 24 horas, e o precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada morna e então reprecipitado pela adição de 3 volumes de acetona e 3 volumes de éter após 4 dias à temperatura de 4°C (fração II).

O esquema 2 representa a obtenção dos derivados de inulina a partir do reagente cloreto de caproíla.

5.2. Reação de inulina com anidrido esteárico e com anidrido propiônico

A reação foi procedida no solvente dimetilformamida (DMF), catalisada por acetato de sódio. Em 10ml de DMF diluiu-se 1,62g de inulina (equivalente a 10mMol de anidro frutose), adicionou-se 1,65g (3mMol) de anidrido esteárico; ou 1,95g (15mMol) de anidrido propiônico. Acrescentou-se também 50mg do catalisador acetato de sódio. As reações foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação com barras magnéticas, durante aproximadamente 60 horas.

Ao meio de reação de inulina com anidrido esteárico, adicionou-se cerca de 2 volumes de 2-butanol, afim de remover-se por precipitação a inulina que não reagiu. O sobrenadante contendo o



Esquema 2 - Síntese de caproil-inulina (**Cp-In**).

produto da reação, foi evaporado até securo na centrífuga à vácuo Savant, marca Sorval, sem aplicação de aquecimento.

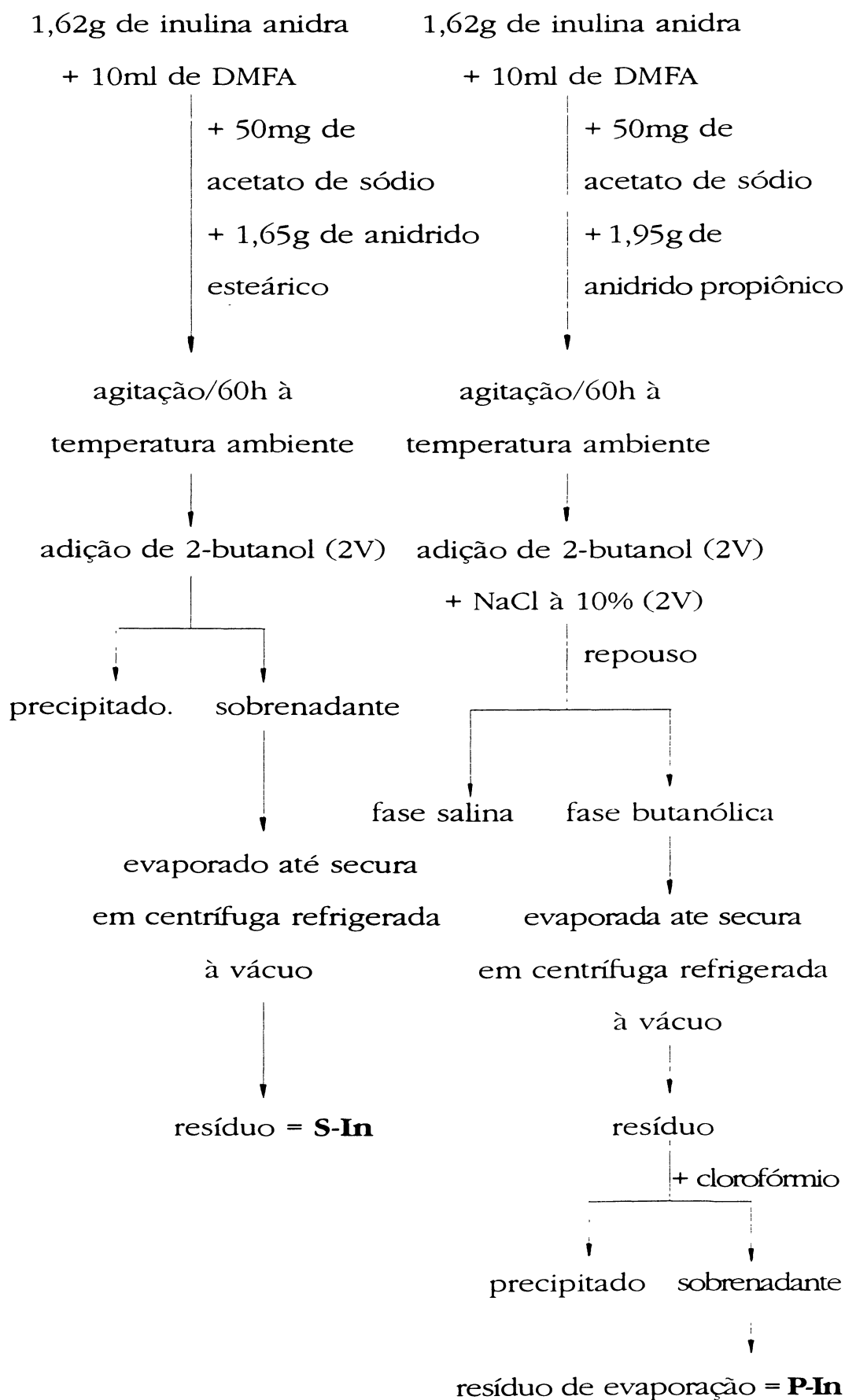
O meio de reação de inulina com anidrido propiônico foi vertido sobre 2 volumes de 2-butanol e misturado. Adicionou-se 2 volumes de uma solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) à 10% e misturou-se por 8 inversões do tubo de ensaio. Após repouso, separam-se as fases butanólica (superior) e salina (inferior). Na fase butanólica fica o produto da reação, na fase salina ficam a inulina que não reagiu, a DMF e o acetato de sódio. A fase butanólica foi evaporada até securo em centrífuga à vácuo. Adicionou-se clorofórmio ao precipitado obtido afim de remover-se eventuais traços de NaCl por precipitação. O sobrenadante clorofórmico contendo o produto da reação de inulina com anidrido propiônico, foi separado e evaporado até securo.

No esquema 3 estão resumidos os passos de obtenção dos derivados de inulina com anidrido esteárico (S-In) e propiônico (P-In).

5.3. Reação de inulina com cloreto de oleila ($C_{18}H_{35}Cl$)

A reação foi realizada através de dois sistemas diferentes: 1- em DMF com acetato de sódio como catalisador; 2- em piridina com carbonato de sódio como catalisador.

No primeiro sistema, acrescentou-se à 1ml de DMF, 162mg de inulina (equivalente à 1mMol de anidro frutose), 5mg de acetato de sódio e 143,5mg (0,5mMol) de cloreto de oleila, em banho de gelo. Após 24 horas sob agitação constante à temperatura ambiente, o meio de reação foi adicionado a 2 volumes de 2-butanol e misturado. Adicionou-se 2 volumes de NaCl 10%, misturou-se por inversões do tubo de ensaio e deixou-se em



Esquema 3 - Síntese de estearil-inulina (**S-In**) e de propionil-inulina (**P-In**).

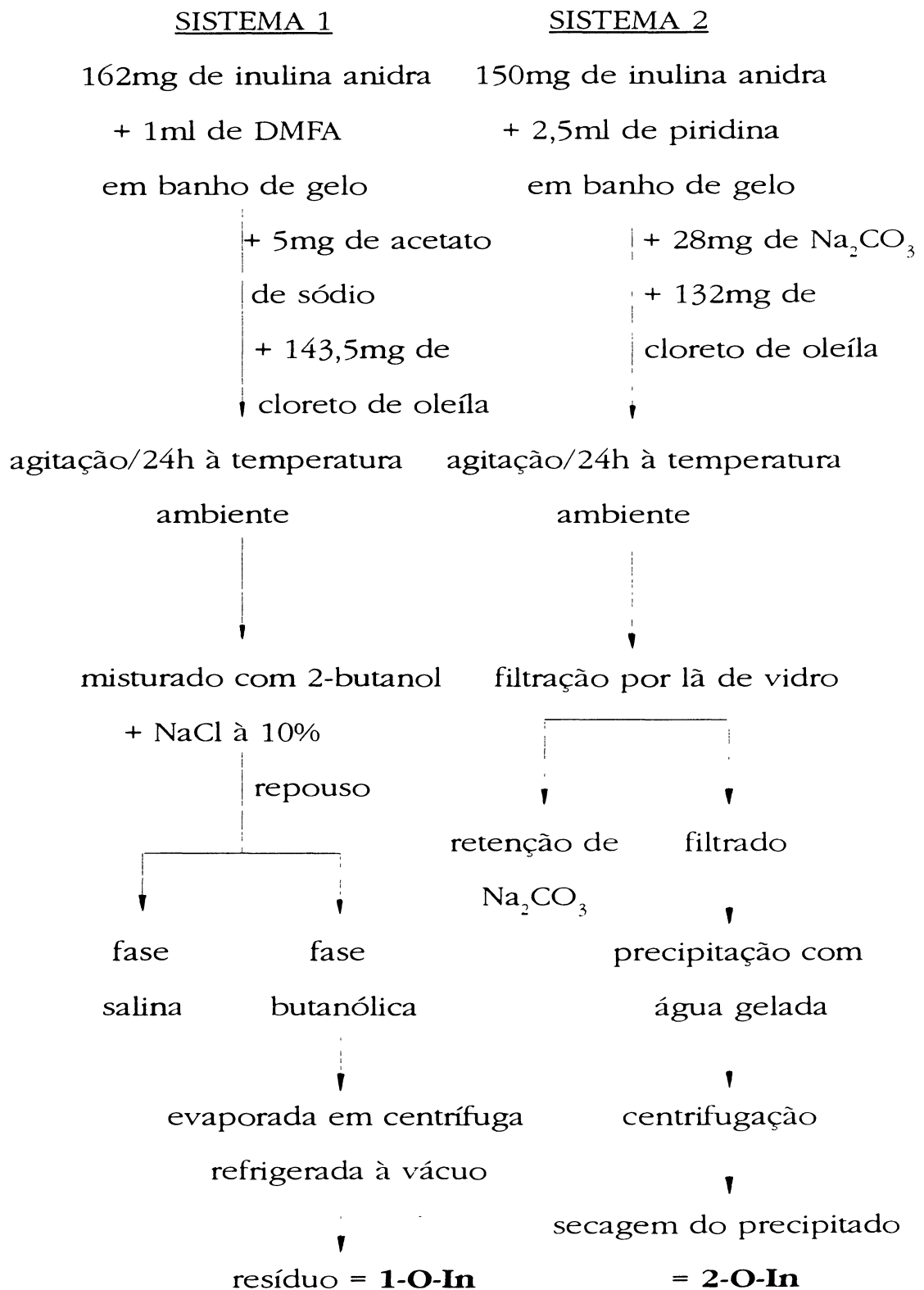
repouso até a separação das fases butanólica e salina. A fase butanólica contendo o produto da reação (1-O-In) foi evaporada no Speed-vac até *secura*.

No segundo sistema, preparou-se 2,5ml de uma solução à 6% (equivalente à 0,92mM de anidro frutose) de inulina em piridina anidra. Acrescentou-se 28mg de Na_2CO_3 e 132mg de cloreto de oleíla (equivalente à 0,46mM) em banho de gelo. A reação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação por 24 horas. O meio de reação foi centrifugado afim de separar o Na_2CO_3 insolúvel, e o sobrenadante foi adicionado a 100ml de água destilada, centrifugado à 17.000rpm por 15 minutos à 4°C, e o precipitado lavado com água por mais 20 minutos. O precipitado contendo o produto da reação (2-O-In) foi seco na centrífuga à *vacuo* Savant.

O esquema 4 mostra os procedimentos realizados na obtenção dos derivados de inulina pelas reações com cloreto de oleíla.

5.4. Reação de inulina com cloreto de colesterila ($\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{Cl}$)

Em 15ml de piridina anidra dissolveu-se 0,9g de inulina (correspondente à 5,55mMol de anidro frutose), adicionou-se 157,5mg de Na_2CO_3 e 675mg (correspondente à 1,67mMol) de cloreto de colesterila, em banho de gelo. Após 24 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente, o meio de reação foi filtrado por lã de vidro, adicionado a 600ml de água destilada, centrifugado e o precipitado lavado com água à 10.000rpm por 15 minutos à 4°C. O precipitado contendo o produto da reação (Cl-In) foi seco na centrífuga à *vácuo* refrigerada.



Esquema 4 - Síntese dos oleil derivados de inulina
(1-O-In e 2-O-In).

O esquema 5 resume os procedimentos para obtenção do derivado de inulina com cloreto de colesterila.

6. Síntese do derivado de sacarose

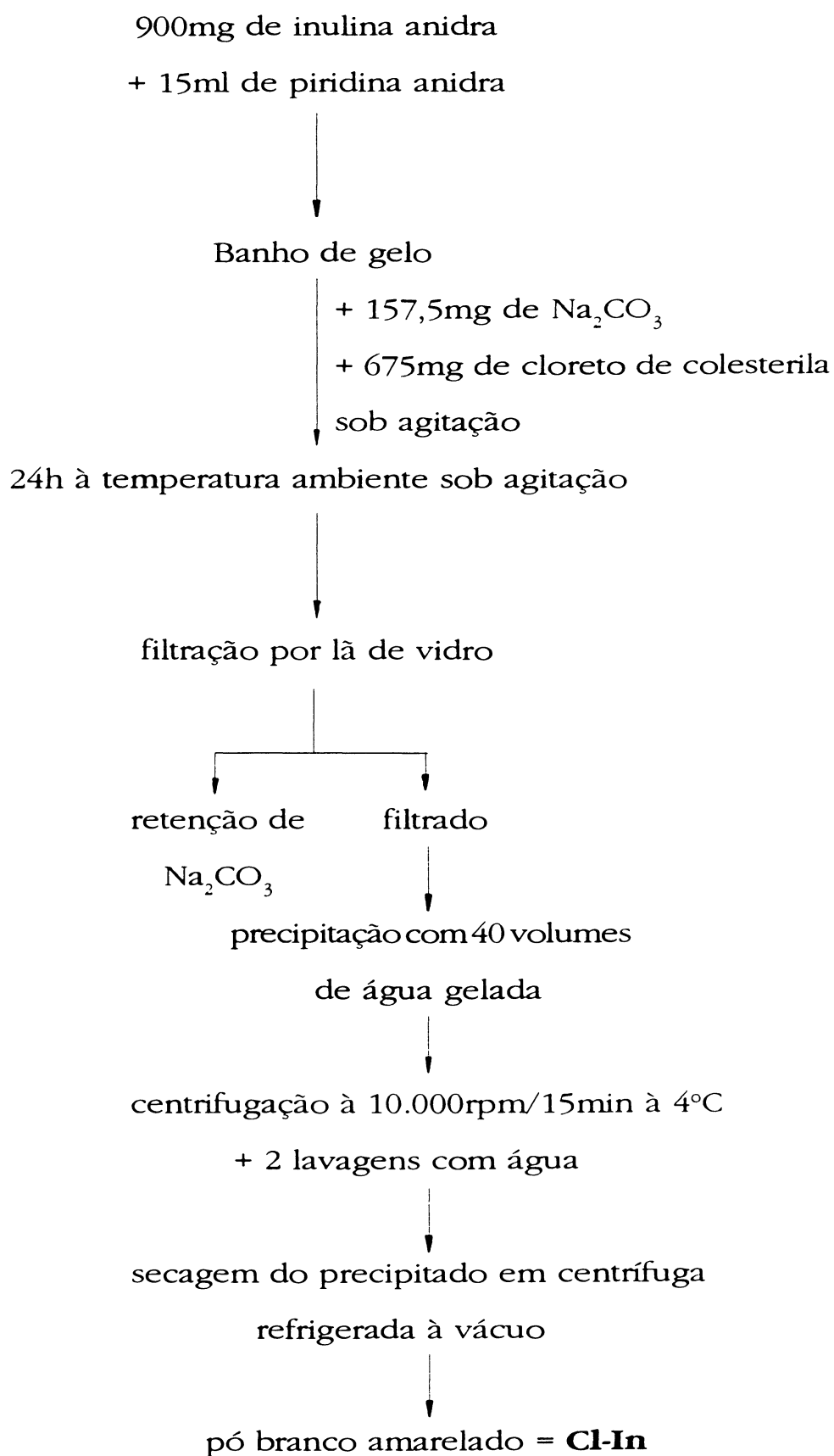
A reação foi realizada em piridina anidra, com Na_2CO_3 como catalisador e cloreto de caproíla como reagente, mantendo-se uma proporção de 2 moles do reagente por mol de anidro sacarose. À 5g de sacarose acrescentou-se 100ml de piridina anidra e deixou-se agitando à 50°C por 72 horas até solubilização total da sacarose. Adicionou-se então 0,95g de Na_2CO_3 e 4,25ml de cloreto de caproíla, em banho de gelo. A reação foi conduzida em balão de fundo redondo, sob vácuo em rotaevaporador, à temperatura de $6-8^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Após centrifugação breve, o sobrenadante do meio de reação foi adicionado lentamente à 5 litros de água destilada, centrifugado à 10.000rpm por 15 minutos à 4°C , para precipitação do produto da reação (dS), que foi lavado 2 vezes com água e a seguir liofilizado.

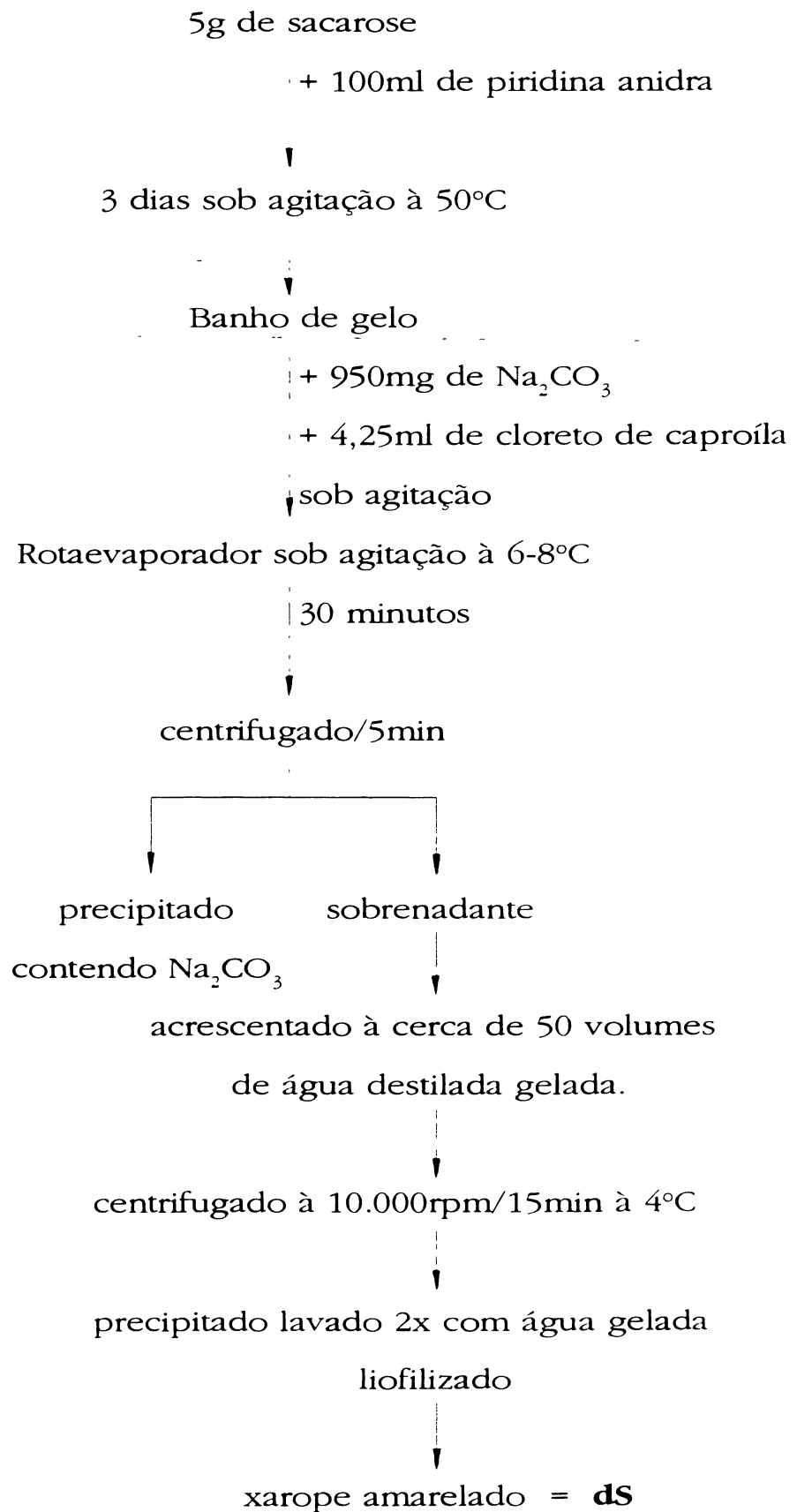
No esquema 6 são apresentadas resumidamente os passos para obtenção deste derivado de sacarose.

7. Caracterização de inulina e seus derivados através de hidrólise acida.

Inulina e seus derivados Cp-In e Cl-In, obtidos respectivamente conforme os esquemas 1, 2 e 5, foram hidrolisados com ácido trifluoroacético (TFA), descrito por ALBERSHEIM et al. (1967).

Alíquotas de 20mg foram adicionadas à 500ul de uma solução 1:1000 de TFA pH 2,0 em tubos com tampa de rosca, e mantidos à 65°C

Esquema 5 - Síntese de colesteril-inulina (**Cl-In**)

Esquema 6 - Síntese de caproil-sacarose (**dS**)

por até 20 minutos. Alíquotas de 50ul dos hidrolisados foram coletadas nos tempos 5, 10 e 20 minutos e resfriadas imediatamente em banho de gelo, e o TFA evaporado até secura na centrífuga à vácuo Savant. Os hidrolisados ácidos foram ressuspensos em 50ul de metanol e analisados por cromatografia em camada delgada.

8. **Microorganismos**

Os microorganismos abaixo relacionados, denominados atualmente como Kluyveromyces marxianus var. marxianus, foram gentilmente cedidos pelo Depto. de Ciência e Tecnologia da ESALQ USP - Piracicaba.

Saccharomyces marxianus (IZ 619)

Saccharomyces marxianus (IZ 1821)

Zygosaccharomyces marxianus (IZ 148)

Saccharomyces fragilis (IZ 275)

Saccharomyces fragilis (IZ 429)

Saccharomyces fragilis (IZ 610)

Saccharomyces muciparus (IZ 426)

Saccharomyces acidifaciens (IZ 1294)

Os demais microorganismos utilizados estavam disponíveis no LQBB, e haviam sido isolados de raízes tuberosas de dalias em decomposição por HAULY & FONTANA(1992).

Aspergillus niger Van Tieghen

Bacteria sp. (YLW)

9. Cultivo líquido dos microorganismos

Os microorganismos foram mantidos no meio sólido constituído (em g%) por: frutose 1,0; extrato de levedura 0,2 e ágar 1,7.

O cultivo das leveduras Kluyveromyces marxianus var. marxianus, desenvolveu-se na presença de inulina ou dos diferentes derivados obtidos deste polissacarídeo, como únicas fontes de carbono, na concentração de 0,5g%, ou na ausência de qualquer fonte de carbono no meio de controle. O meio básico continha 0,2g% de extrato de levedura, suplementado ou não com fosfato de amônio monobásico 0,1g%. Em frascos Erlenmeyer de 50ml, contendo 5ml de meio, desenvolveram-se os cultivos em batelada (“batch culture”), à temperatura de 28°C, sob agitação de 110rpm por períodos de até 70 horas.

O fungo Aspergillus niger foi cultivado no meio sugerido por NAKAMURA et al. (1978 a) contendo (em g%): peptona 0,5; extrato de levedura 1,0; fosfato de amônio monobásico 1,2; cloreto de potássio 0,07; sulfato de magnésio heptahidratado 0,05; sulfato de ferro heptahidratado 0,001; inulina ou seus derivados como fonte de carbono na concentração de 0,5g%. Os cultivos em batelada (“batch”), foram realizados em tubos com tampa de rosca, com 5ml de meio de NAKAMURA, à temperatura de 28°C, sob agitação à 110rpm por até 120 horas, em agitador rotatório da Bodin (EUA), inclinado em 45°.

A bactéria YLW isolada de raízes tuberosas de dalias em decomposição, foi cultivada no meio composto de: extrato de levedura 0,2g%; inulina ou seus derivados como única fonte de carbono na concentração de 1g%. O processo desenvolveu-se em frascos Erlenmeyer de 25ml contendo 5ml de meio, à temperatura de 28°C, sob agitação à 110rpm, por até 48 horas.

O crescimento celular foi medido por absorbância à 650nm.

10. Determinação da atividade de inulinase EC 3.2.1.7 (2,1-β-D-frutana-frutanahidrolase)

Para determinação de atividade de inulinase, o sistema de reação foi constituído de 100ul de enzima, ou do sobrenadante livre de células dos cultivos do fungo e leveduras; 400ul de inulina 2% (P/V) recém-aquecida e solubilizada em tampão acetato 100mM de pH 5,0 e incubado à 50°C por 3 horas.

A geração de açúcares redutores totais no meio de reação foi analisado pelo método de DNS (dinitrosalicilato), segundo SUMMER (1929).

Uma unidade de atividade enzimática (U/ml) foi definida como a quantidade de frutose liberada em micromoles por hora, por ml de enzima, nas condições do ensaio.

11. Métodos Gerais

As sínteses dos derivados de sacarose e inulina com o reagente cloreto de caproíla foram realizadas em evaporador rotatório Buchi, modelo RE 120, à vácuo e em banho com temperatura externa de 5-8°C.

As determinações de pH foram efetuadas em potenciômetro marca Micronal B-247, à temperatura ambiente.

As centrifugações foram realizadas em centrífuga marca Fanem, modelo 204-SR, ou em centrífuga refrigerada marca Sorval, modelo RC-5, ou ainda centrífuga Beckman J-21B.

A secagem dos produtos obtidos foi realizada em Centrífuga à vácuo SAVANT da SORVAL ou em liofilizador.

As esterilizações dos meios de cultivo foram feitas em

autoclave marca Fanem, modelo 103, durante 45 minutos sob vapor fluente, ou à 1 atmosfera durante 15 minutos.

Os cultivos foram conduzidos em agitador-incubador, de movimento rotatório New-Brunswick à 28°C e 110 rpm, ou alternativamente, sob as mesmas condições de agitação e temperatura, no agitador compacto Bodin.

As hidrólises ácidas e enzimáticas foram realizadas em banho-maria, respectivamente à temperatura de 65°C e 50°C.

12. Métodos analíticos

12.1. Carboidratos totais

O método do fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS et al. (1956) foi empregado na determinação do perfil de eluição de inulina e seus derivados quando aplicados em coluna de Biogel-P6.

12.2. Carboidratos redutores

A determinação de carboidratos redutores foi feita pelo método do DNS, descrito por SUMMER (1929), e a curva padrão foi construída utilizando-se D-glucose na faixa de 0,25 à 2,0mg, com volume final de 5ml. As leituras foram feitas à 540nm.

12.3. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas nos cultivos livres de células foi realizada pelo método de PETERSON (1977), com o reagente de Folin-

Ciocalteu. Um padrão de soroalbumina bovina foi utilizado na faixa de 5 à 50ug na construção da curva padrão. As leituras foram feitas à 750nm.

12.4. Análises cromatográficas

12.4.1. Cromatografia em camada delgada

O método empregado de cromatografia em camada delgada (t.l.c.), foi desenvolvido em placas de sílica-gel G-60 sobre alumínio, da MERCK.

Os sistemas de solventes empregados foram:

- isopropanol : nitrometano : acetato de etila :

etilmetilcetona : água (50 : 45 : 50 : 25 : 30)

- butanol : isopropanol : água : acetato de etila

(3 : 12 : 4 : 2)

- acetato de etila : metanol : água (10 : 10 : 1)

- isopropanol : nitrometano : acetato de etila : ácido acético :
água (20 : 8 : 4 : 8 : 1)

- clorofórmio : ácido acético : água : isopropanol (6 : 5 : 2 : 2)

A visualização dos compostos foi feita por revelação com os reagentes : orcinol-sulfúrico com aquecimento à 80-100°C por 10 minutos conforme LEWIS & SMITH (1969); rodamina B com visualização em câmara de U.V. para detecção de ácidos graxos; e vapor de iodo para detecção de ácidos graxos insaturados, DAWSON et al (1991).

12.4.2. Cromatografia em coluna de Biogel P-6

Inulina e seus derivados obtidos por reação com cloreto de caproíla e cloreto de colestera, foram eluídos numa concentração de 10mg/ml com o solvente dimetilsulfóxido, em coluna de Biogel P-6, pré-equilibrada com DMSO. O fluxo máximo da coluna conseguido foi de 2ml/hora e frações de 0,5ml foram coletadas e analisadas quanto à presença de açúcares totais pelo método de fenol-sulfúrico, DUBOIS et al. (1956).

12.4.3. Cromatografia líquida de alta resolução (H.P.L.C.)

Esta análise foi conduzida em aparelho da Waters constituído por uma bomba isocrática/gradiente (SC 600 E), injetor automático (Wisp 712), forno de coluna e detector de índice de refração (410 DR). A coluna utilizada foi a CAC (Waters) e o solvente empregado constituído de acetonitrilo:metanol:água (7:2:1), à temperatura de 65°C, e fluxo de 2ml/min.=282psi.

12.5. Espectroscopia de infra-vermelho

Espectros no infra-vermelho de inulina e de seu derivado obtido por reação com cloreto de colestera foram feitos pelo método com transformação de Fourier, em um aparelho de FTIR (“Fourier transform infrared-spectroscopy”) marca Perkin-Elmer, modelo 1600.

12.6. Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^{13}C

Os espectros das amostras de inulina e do seu derivado obtido por reação com cloreto de caproíla foram feitos em um espectrômetro com transformação de Fourier, da marca Bruker, modelo AC-300-P. As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido deuterado. O espectro da inulina foi obtido à temperatura de 70° C e o do derivado caproilado à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Raízes tuberosas de Dahlia pinnata como fonte de inulina

As plantas denominadas dalias estão incluídas na família das Compositae e no gênero Dahlia, descrito por DAMP (1981). A Dahlia pinnata é uma planta perene, cultivada facilmente em quase todo território brasileiro, com finalidade ornamental. Do ponto de vista biotecnológico, no entanto, estas plantas são de grande interesse devido ao acúmulo, em suas raízes tuberosas, de inulina como carboidrato de reserva. Cada planta desenvolve grandes e numerosas raízes, como pode ser visto nas figuras 6 e 7.

Neste trabalho, as raízes tuberosas de espécies híbridas de Dahlia pinnata foram obtidas a partir das plantas mantidas no canteiro experimental do Departamento de Bioquímica da UFPr em Curitiba. As raízes foram coletadas no início do outono, em março de 1992.

A composição básica das raízes tuberosas descascadas de dalias, segundo determinação feita por HAULY (1991), é de cerca de 75% de umidade; 0,36% de cinzas; 4,20% de fibras; 4% de proteínas; 4,20% de lipídeos e 12,5% de carboidratos totais; sendo que, destes últimos, a maior parte é de natureza polimérica. Estes resultados demonstraram que as raízes tuberosas de dalias representam uma boa fonte para extração de inulina, quando comparada aos tubérculos de alcachofra de Jerusalém, que segundo KOSARIC et al. (1985) possuem de 15 à 20% de carboidratos (peso úmido), sendo a fonte mais amplamente empregada com esta finalidade.



Figura 6 - Exemplares de espécies híbridas de Dahlia pinnata.



Figura 7 - Raízes tuberosas de espécies híbridas de Dahlia pinnata.

2. Extração de inulina de raízes tuberosas de dália

Para obtenção de inulina foram empregados os procedimentos idealizados por FONTANA e utilizados por HAULY (1991) com algumas modificações, a fim de se reduzir a presença de açúcares redutores no produto final, devido a alguma hidrólise do polímero durante o processo descrito.

As cascas das raízes tuberosas de dalias foram removidas porque contêm maior concentração de celulose, hemicelulose e pigmentos indesejáveis, que interfeririam nos experimentos a serem realizados com a inulina. Além disso, na casca e adjacências, ocorrem reações mais intensas de escurecimento (“browning”) provavelmente devido à ação de fenol oxidases.

Os pequenos pedaços de polpa foram mantidos em solução tampão de fosfato de sódio 0,1M pH 6,5, à temperatura de 70°C, e aos poucos foram sendo homogeneizadas em liquidificador, a fim de solubilizar a inulina, procedimento este eficaz também para inativar enzimas capazes de degradar o polímero, que segundo EDELMAN & BACON (1951), podem estar presentes nos extratos vegetais.

Após filtração à quente deste material, a maior parte da inulina foi precipitada por resfriamento à 4°C. O rendimento deste precipitado, com base em peso seco, foi em torno de 50% de inulina, isenta de poder redutor, conforme determinação feita pelo método de DNS, o que torna este procedimento vantajoso em relação ao empregado previamente, no qual a inulina era obtida por aquecimento e concentração previa do filtrado.

Comparativamente aos rendimentos descritos por KOSARIC et al. (1985) para tubérculos de alcachofra de Jerusalém, que contêm 75%

de inulina em peso seco, a partir de 15 à 20% de carboidratos (em peso úmido), pode-se considerar aceitável o resultado obtido com as raízes tuberosas de dalias.

3. Purificação de inulina

Através da extração descrita, a inulina obtida apresentou uma coloração amarelada, indicativa da presença de substâncias contaminantes, que foram eficazmente eliminadas com o emprego de DEAE celulose-Cl⁻, em função de seu comportamento aniônico. O grau de clareamento foi ainda maior do que o obtido pelo tratamento com carvão ativo empregado por HAULY (1991), como mostrado na figura 8.

A inulina assim purificada, após devidamente liofilizada, foi utilizada em todos os experimentos descritos adiante.

4. Síntese dos derivados de inulina

4.1. Caproil-derivado

A escolha do cloreto do ácido capróico, ao invés do próprio ácido, como reagente na obtenção deste derivado de inulina, foi devida a duas razões essenciais. Primeiro porque é mais cômodo recorrer ao cloreto do ácido do que utilizar diretamente o ácido, pois a reação além de ser mais rápida e também irreversível. Segundo porque a inulina é um composto facilmente hidrolisável em meio ácido, tornando-se portanto indesejável o uso de qualquer ácido como reagente.

Outra possível alternativa ao emprego do cloreto de

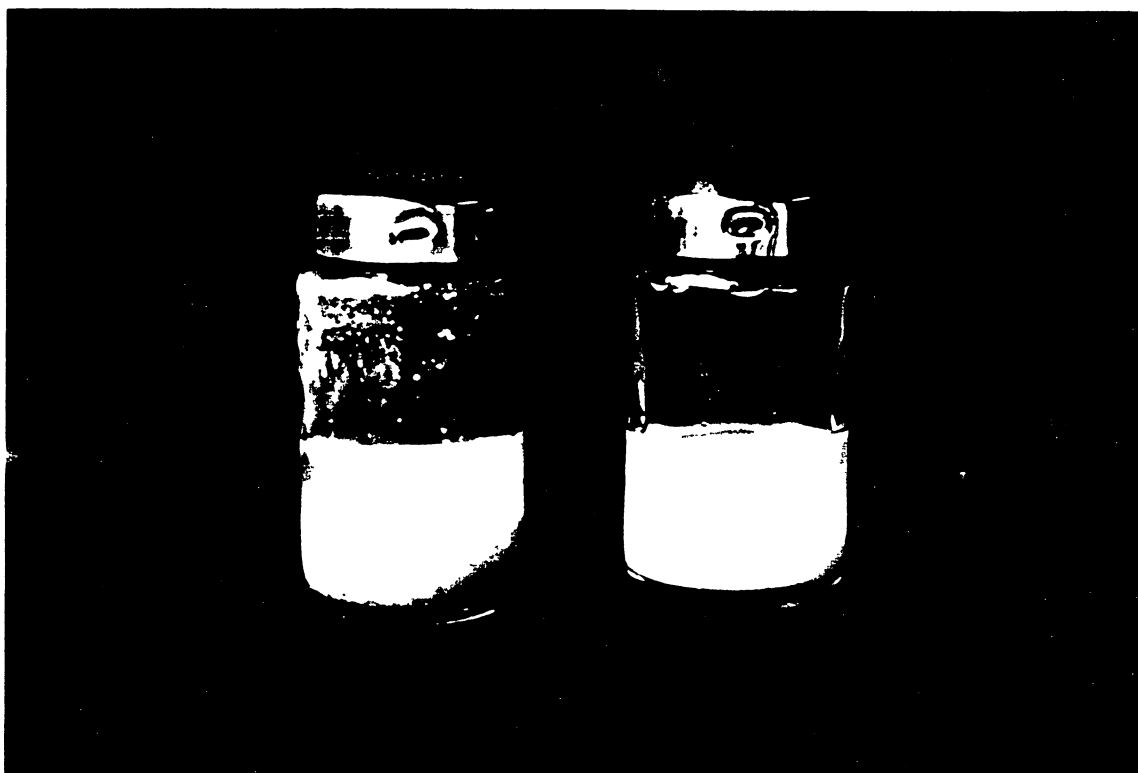


Figura 8 - Inulina de Dahlia antes e após purificação em camada de DEAE celulose-Cl.

caproíla, seria a utilização do anidrido deste ácido carboxílico, o qual apresentaria a mesma reação do cloreto do ácido, embora um pouco menos ativa, com a vantagem de não formar ácido clorídrico de ação corrosiva, tóxica e hidrolítica. Na falta deste reagente, optou-se pelo uso do cloreto de caproíla, disponível no LQBB.

A fim de se evitar o inconveniente do HCl co-gerado, a adição de cloreto de caproíla à solução de inulina em DMSO e piridina anidra foi feita lentamente, em banho de gelo, e a reação foi conduzida a baixas temperaturas (5-8°C), sob vácuo, na presença de Na₂CO₃ anidro como agente neutralizador do HCl gerado, conforme demonstrado no esquema 2.

O emprego de DMSO visou facilitar a dissolução do polímero (insolúvel em água fria), e também por ser um solvente polar aprótico, o qual não promove a solvatação por pontes de hidrogênio que desativaria o nucleófilo. Segundo SYKES (1985), o efeito deste tipo de solvente é o de aumentar enormemente a efetividade do nucleófilo no sistema, comparativamente ao uso de solvente polar prótico.

A piridina é um composto aromático que possui um par de elétrons disponível no orbital sp² do nitrogênio, configuração eletrônica esta que transmite à piridina o caráter básico ($K_b = 2,3 \cdot 10^{-9}$), MORRISON & BOYD (1973). BONNER & HILLIER (1973) verificaram que na acilação de fenóis com anidridos carboxílicos, a piridina funcionou como catalisador básico. Conforme exemplificado na figura 9, a formação do complexo piridina-fenol (por ponte de hidrogênio) torna o íon fenolato altamente reativo neste estado de transição. Portanto, um mecanismo semelhante a este deve ocorrer também na caproilação da inulina nativa em seus pontos de inserção preferenciais, ou seja, nos grupos -OH primários da unidade de frutose terminal.

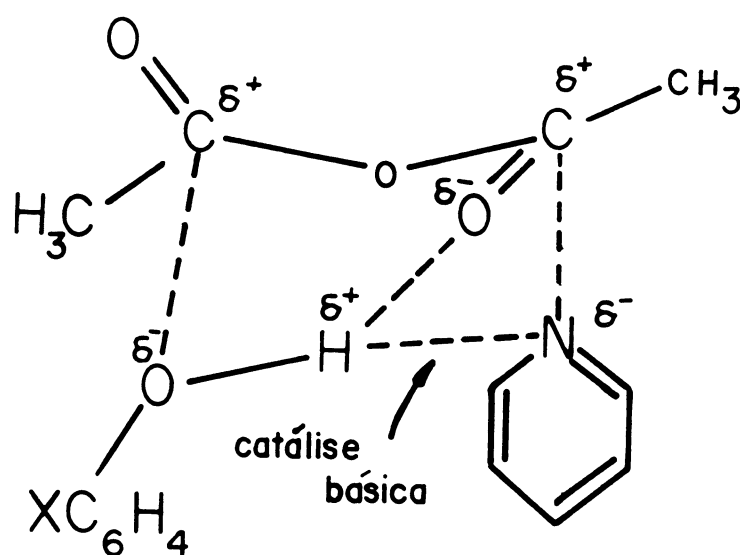


Figura 9 - Configuração possível no estado de transição da acilação de fenóis por anidrido acético, catalisada por piridina. BONNER & HILLIER (1973).

Na fase de recuperação do produto do meio de reação, foram obtidas duas frações, denominadas **Cp-In** (ou Fração I) de 7,250g, e Fração II de 0,350g (pesos dos produtos secos liofilizados). Estas quantidades foram obtidas a partir de 6g de inulina. Ambas as frações apresentaram-se como pós amarelados, solúveis em água.

4.2. Propionil e Estearil-derivados

A obtenção destes derivados foi conduzida no solvente dimetilformamida (DMF) adicionado de acetato de sódio como catalisador. Nestes dois casos os doadores acila foram os anidridos dos ácidos propiônico e esteárico (esquema 3). Este foi o sistema de reação de escolha entre os demais testados, pois foi o único no qual a presença de produto derivatizado foi detectada através de cromatografia em camada delgada (solvente clorofórmio : ácido acético : água : isopropanol nas proporções de 3 : 2,5 : 1 : 1) após revelação com rodamina (visualização ao U.V.), seguida de orcinol sulfúrico, onde as manchas dos produtos tiveram maior migração do que o padrão de frutose, aparecendo praticamente junto ao front (fig.10a). Os outros sistemas testados sem sucesso foram realizados em: piridina; tetracloreto de carbono com piridina; e dimetilformamida com carbonato de sódio.

4.3. Oleil-derivados

Neste caso foi escolhido o cloreto de oleíla como doador acila na síntese do derivado de inulina. O esquema 4 resume os dois sistemas empregados em que houve a detecção de produtos por cromatografia em camada delgada (solvente acetato de etila : metanol : água na proporção

de 10 : 10 : 1), após revelação com vapor de iodo, seguido de orcinol sulfúrico, onde as manchas dos produtos apareceram junto ao front, acima do padrão de frutose (fig.10b).

4.4. Colesteril-derivado

A obtenção deste derivado de inulina foi realizada em condições semelhantes às empregadas na síntese do caproil-derivado (Cp-In). O solvente empregado foi a piridina anidra adicionada de carbonato de sódio, que não só neutraliza o HCl que de outra forma interferiria hidroliticamente, como ainda catalisa a reação. A proporção milimolar de anidrofrutose e cloreto de colesterila foi de 10 : 3 respectivamente. Devido à baixa reatividade do reagente o período de reação foi maior, cerca de 24 horas, e a incubação foi à temperatura ambiente. A recuperação do produto (**Cl-In**) foi feita através de precipitação em água gelada, e o material devidamente lavado para remoção total de solvente residual, resultou após liofilização, em 0.750g de um pó amarelado, pouco solúvel em água, obtido a partir de 0,9g de inulina.

5. Síntese do derivado de sacarose

O reagente empregado nesta derivatização da sacarose foi o cloreto de caproila, e o método foi semelhante ao utilizado na síntese de caproil-inulina. A recuperação do produto (**ds**) foi por precipitação em água, e após liofilização apresentou-se como um xarope amarelado. Através de análise por cromatografia em camada delgada (fig.10c), observou-se que praticamente toda a sacarose foi derivatizada, sendo visualizada ao U.V. após revelação com rodamina, bem acima do padrão

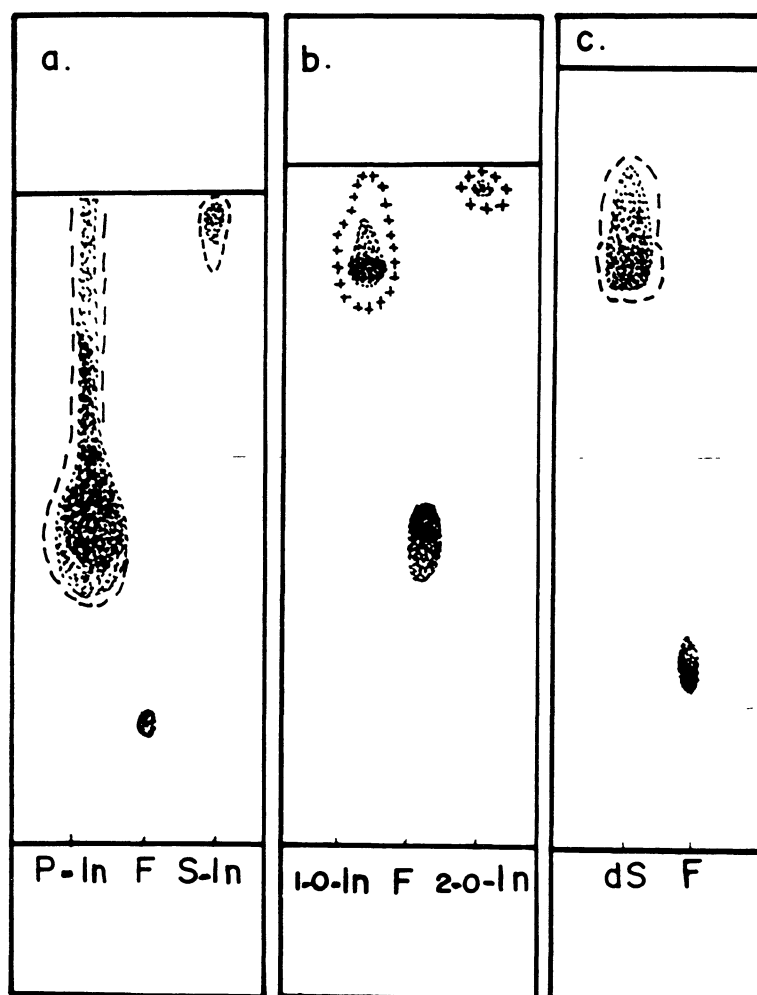


Figura 10 - Cromatografia em camada delgada de:

- a) P-In = propionil-inulina revelado com rodamina B (- -) e depois com orcinol sulfúrico (:.).
- S-In = estearil-inulina revelado com rodamina B (- -) e com orcinol sulfúrico (:.).
- b) 1-O-In = oleil-inulina obtida pelo sistema 1, revelado com vapor de iodo (++) e com orcinol sulfúrico (:.).
- 2-O-In = oleil-inulina obtida pelo sistema 2, revelado com vapor de iodo (++) e com orcinol sulfúrico (:.).
- c) dS = caproil-sacarose revelada com rodamina B e com orcinol sulfúrico.
- F = padrão de frutose

de frutose, quase junto ao front. O solvente empregado neste caso foi isopropanol: nitrometano: acetato de etila: etilmetilcetona: água na proporção de 50:45:50:25:30.

6. Caracterização de Inulina, Cp-In e Cl-In por Hidrólise Ácida

A análise por cromatografia em camada delgada dos hidrolisados ácidos obtidos conforme descrição em materiais e métodos, permite observar os produtos destas hidrólises como sendo principalmente frutose e oligossacarídeos de inulina, e nos derivados de inulina Cp-In e Cl-In, também nota-se a ocorrência de cerca de dois outros componentes diferentes, os quais apresentaram maior migração do que a frutose e foram revelados com rodamina B, a qual detecta a presença de ácidos graxos (fig.11). Devido ao caráter lipofílico dos substituintes graxos nos derivados, estes apresentaram maior afinidade pelo solvente utilizado (50:45:50:25:30), (isopropanol: nitrometano: acetato de etila: etilmetilcetona: água), desenvolvendo portanto o padrão de migração observado.

7. Cultivo de Microorganismos Inulolíticos em inulina nativa e nos substratos derivatizados.

Os ensaios preliminares na avaliação dos efeitos dos diferentes substratos na produção/secreção de enzima inulolítica foram realizados com o fungo Aspergillus niger isolado de tubérculos de dalias em decomposição, por Haully (1991).

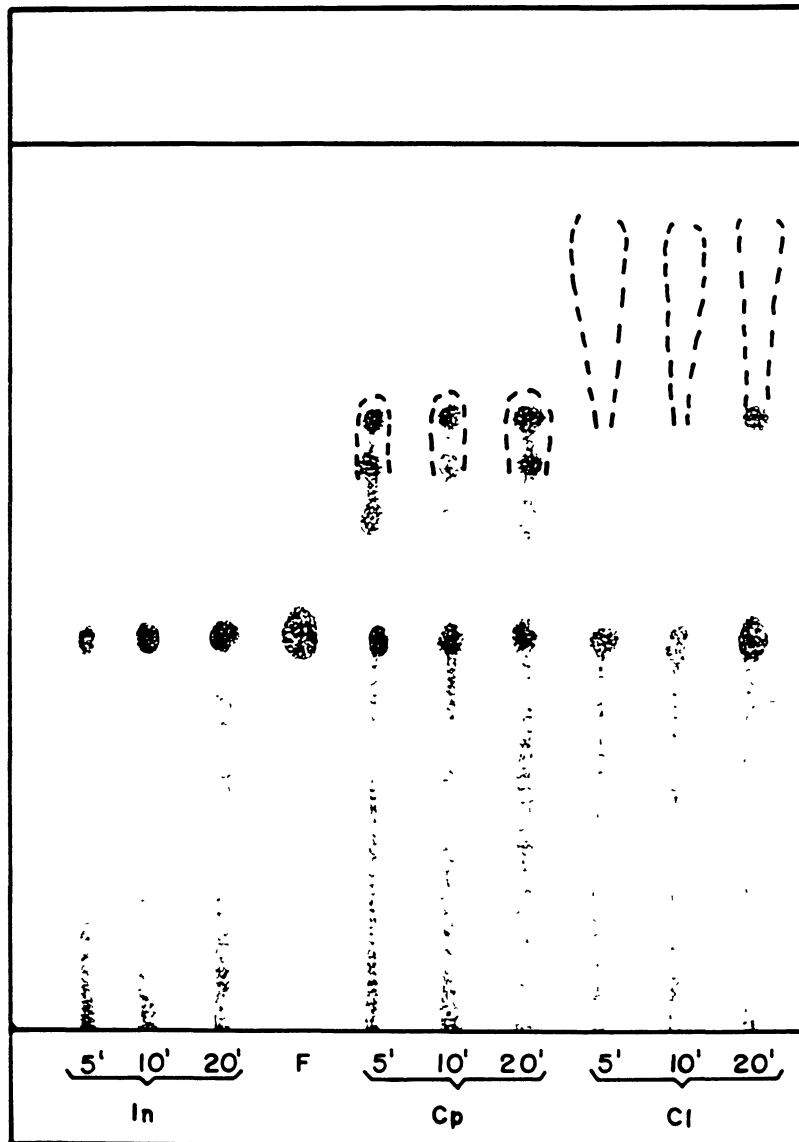


Figura 11 - Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados ácidos de inulina, **Cp-In** e **Cl-In** obtidos à 65°C em TFA pH 2,0.

-- = revelados com rodamina B, visualizados ao U.V.

∴ = revelados com orcinol sulfúrico, por aquecimento.

F = padrão de frutose

In - 5', 10' e 20' = inulina após 5, 10 e 20 minutos de hidrólise.

Cp - 5', 10' e 20' = **Cp-In** após 5, 10 e 20 minutos de hidrólise.

Cl - 5', 10' e 20' = **Cl-In** após 5, 10 e 20 minutos de hidrólise.

7.1. Indução de inulinase em Aspergillus niger

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos em até 96 horas de cultivo, das atividades de inulinase encontradas nos sobrenadantes livres de células dos cultivos de A. niger em 9 diferentes substratos e no meio controle isento de fonte de carbono, tendo como meio básico o meio de Nakamura.

Observa-se que em relação às atividades obtidas nos cultivos do meio de controle, nenhum dos substratos apresentou efeito inibitório da produção constitutiva de inulinase. Uns apresentaram efeito estimulatório mais acentuado, outros menos. Interessante notar que em relação à atividade obtida em sacarose, a obtida com o caproil-derivado de sacarose (**dS**), foi cerca de 6,3 vezes maior após 96h de cultivo. Comparativamente às atividades observadas com inulina nativa como fonte de carbono, sobressaíram-se as obtidas com os substratos dS, Cp-In e Cl-In, onde houve um aumento de cerca de 1,3, 1,3 e 2,3 vezes respectivamente na atividade de inulinase após 96h de cultivo.

Com base nestes resultados preliminares, decidiu-se explorar o efeito dos derivados de inulina Cp-In e Cl-In na produção/secreção de inulinase por leveduras inulolíticas selecionadas entre as do gênero Kluyveromyces.

Tabela 2 - Efeito de substratos modificados quimicamente no rendimento de inulinase de Aspergillus niger.

Substrato **	Atividade de inulinase'			
	24h	42h	66h	96h
C	0,35	0,44	0,55	0,67
Sac	1,17	1,72	1,22	1,33
In	1,00	2,28	3,89	6,39
dS	0,78	1,28	3,22	8,44
Cp-In	0,89	1,83	2,33	8,50
1-O-In	0,55	0,83	1,00	1,33
2-O-In	0,72	0,83	1,11	1,22
Cl-In	0,72	2,44	5,72	14,50
P-In	0,67	0,72	0,83	1,22
S-In	0,67	0,83	1,78	4,00

(*) em micromoles de frutose liberados por hora por ml de meio de cultivo livre de células.

(**): C = meio de Nakamura sem fonte de carbono.

Sac = meio de Nakamura + sacarose

In = meio de Nakamura + inulina

dS = meio de Nakamura + caproil-sacarose

Cp-In = meio de Nakamura + caproil-inulina

1-O-In = meio de Nakamura + oleil-inulina 1

2-O-In = meio de Nakamura + oleil-inulina 2

Cl-In = meio de Nakamura + colesteril-inulina

P-In = meio de Nakamura + propionil-inulina

S-In = meio de Nakamura + estearil-inulina

7.2. Indução de inulinase em Kluyveromyces marxianus

Dentre as 8 espécies de Kluyveromyces marxianus var. marxianus testadas, 6 apresentaram crescimento em meio de cultivo contendo inulina como fonte de carbono, extrato de levedura e fosfato de amônio monobásico. As cepas IZ 610 e IZ 1294 não cresceram mesmo após 60h de cultivo, sendo portanto descartadas. Entre as demais, duas pareceram particularmente interessantes de serem estudadas, devido ao comportamento distinto que apresentaram neste teste preliminar. A cepa IZ 619 foi a única que apresentou crescimento igualmente abundante, tanto no meio suplementado com fosfato de amônio monobásico como no não suplementado, após 60h de cultivo. A cepa IZ 275 foi a única que cresceu moderadamente no meio suplementado, mas que praticamente não cresceu no meio não suplementado, sendo aparentemente condicionada à presença do fosfato de amônio.

Foram escolhidas portanto as cepas IZ 619 e IZ 275 de Kluyveromyces marxianus como os microorganismos inulolíticos alvo na avaliação dos efeitos dos derivados de inulina **Cp-In** e **Cl-In**, na produção/secreção de inulinase.

Na tabela 3 e figuras 12a e b estão registrados os resultados das atividades de inulinase em unidades de enzima / ml de meio de cultivo livre de células. Nos cultivos, além de variarem-se as fontes de carbono, foi também explorado o efeito da presença ou ausência de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ no meio básico.

Pode-se observar nitidamente em todos os casos, que o derivado caproilado de inulina mostrou-se o melhor indutor da produção de inulinase.

Tabela 3 - Efeito de inulinas modificadas quimicamente no rendimento de inulinase nos cultivos das leveduras selecionadas.

IZ 275 Atividade de inulinase*		IZ 619 Atividade de inulinase				
Fonte de carbono	N-P* supl.	Tempo de cultivo		Tempo de cultivo		
		24h	70h	24h	46h	70h
**						
C	-	0,18	0,70	0,18	0,21	0,38
In	-	0,24	0,89	0,59	1,61	2,98
Cp-In	-	1,53	6,04	1,80	3,46	5,40
Cl-In	-	0,23	0,86	0,73	1,61	3,41
						
C	+	0,21	0,83	0,44	0,51	0,89
In	+	0,25	1,08	0,46	0,62	1,20
Cp-In	+	1,05	5,27	3,43	5,16	5,85
Cl-In	+	0,25	0,83	1,24	2,89	4,93

(#) Atividade de inulinase expressa em mg de açúcares redutores liberados por hora por ml de meio de cultivo livre de células

(*) Suplementação com 0,1g% de fosfato de amônio monobásico.

(**): C = meio básico contendo 0,2g% de extrato de levedura

In = meio básico + inulina nativa

Cp-In = meio básico + caproil-inulina

Cl-In = meio básico + colesteril-inulina

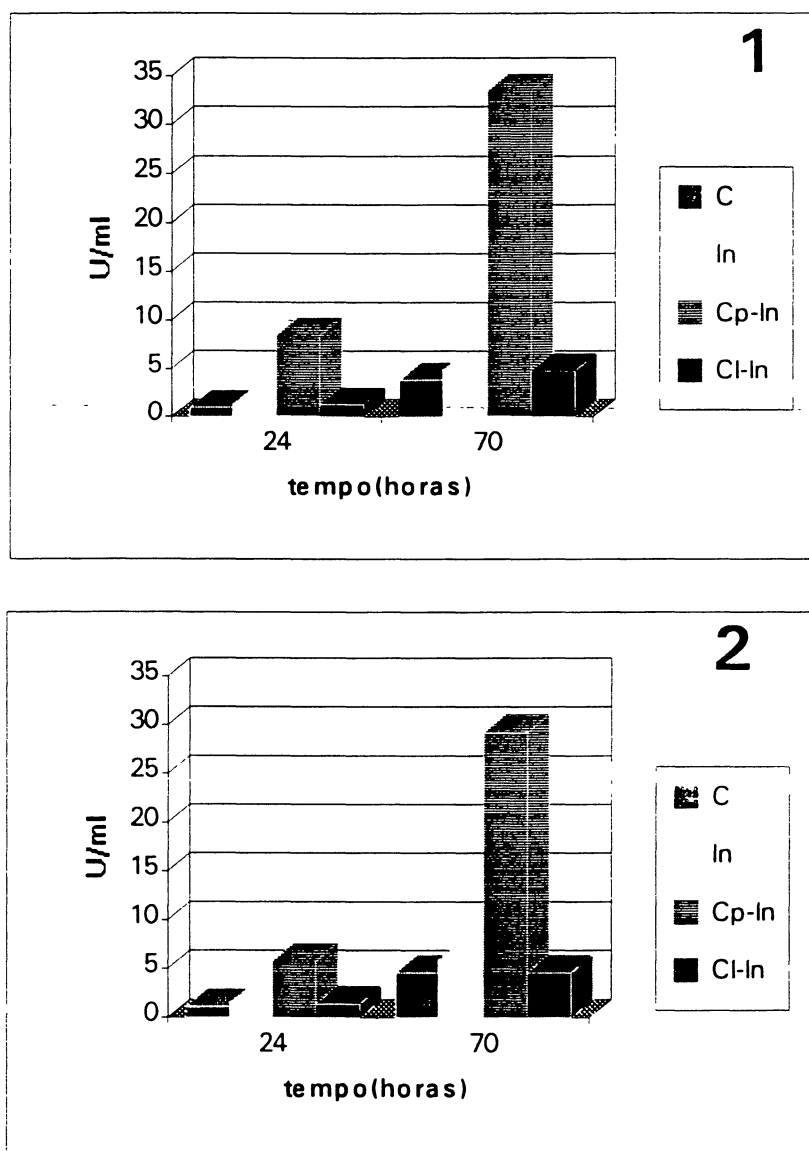


Figura 12 (a) - Perfil de indução de inulinase na cepa IZ-275 de Kluyveromyces marxianus.

1. sem suplementação de fosfato de amônio monobásico no meio de cultivo.

2. com suplementação de fosfato de amônio monobásico no meio.

Os dados da tabela 3 foram convertidos em unidades de inulinase/ml, i.e., micromoles de frutose livre liberados por hora por ml de meio de cultivo livre de células.

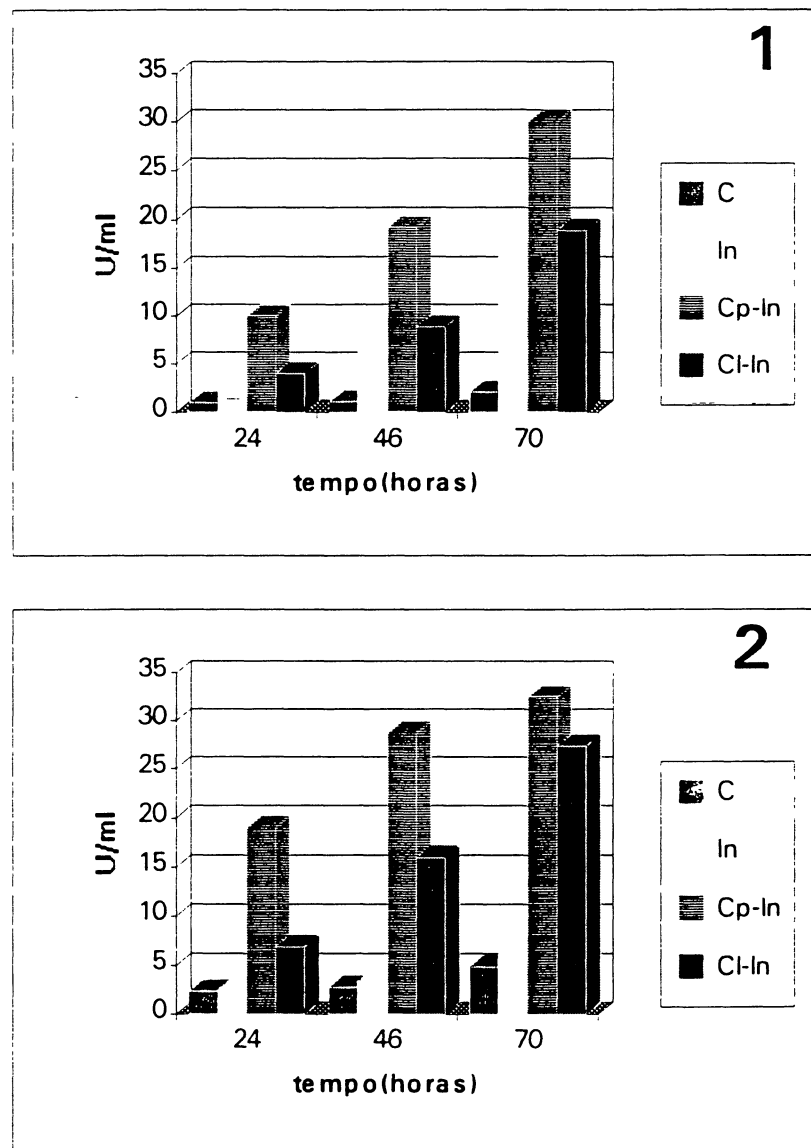


Figura 12 (b) - Perfil de indução de inulinase na cepa IZ-619

de

Kluyveromyces marxianus.

1. sem adição de fosfato de amônio monobásico ao meio de cultivo

2. com suplementação de fosfato de amônio monobásico ao meio.

Atividade de inulinase expressa em unidades de inulinase/ml conforme figura 12 (a).

A atividade enzimática no meio de cultivo contendo **Cp-In** da cepa IZ 275 após 70h, foi de 4,9 à 6,8 vezes maior do que a observada no meio contendo inulina nativa como fonte de carbono. Com esta levedura em particular, o derivado **Cl-In** não induziu a produção de inulinase visto que os níveis obtidos foram muito próximos aos níveis basais, dos meios de controle.

A cepa IZ 619 chegou a produzir com **Cp-In** como fonte de carbono, ate 8,3 vezes mais inulinase quando comparada à quantidade obtida com inulina nativa no meio suplementado com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ após 46h de cultivo. O nível basal baixo de inulinase (constitutiva) foi aumentado significativamente na presença de inulina nativa, de 3,3 à 7,8 vezes entre 24h e 70h de cultivo, no meio não suplementado. Com o derivado **Cp-In**, o aumento observado na atividade de inulinase foi ainda maior, de cerca de 1,8 vezes em relação a obtida com inulina nativa é de 14,2 vezes quando comparado ao controle, do meio não suplementado após 70h de cultivo. O derivado **Cl-In**, que para a cepa IZ 275 não foi um bom indutor de inulinase, apresentou um bom efeito estimulatório, tanto em valores absolutos como também em valores relativos aos meios referenciais com ou sem inulina nativa, para a cepa IZ 619.

De acordo com VANDAMME & DERYCKE (1983), a adição de inulina como fonte de carbono é um pré-requisito para a síntese / secreção de inulinase pelos microorganismos. A adição ao meio de cultura de um substrato / indutor, ou de um seu derivado estrutural, pode estimular um aumento na síntese da enzima pelos microorganismos. Também os produtos da ação enzimática, particularmente no caso do processamento de polissacarídeos por hidrolases, podem agir como

indutores de enzimas. A razão para isto é que, a habilidade indutora real de um substrato polimérico resulta da sua transformação em moléculas mais versáteis, como por exemplo, os dissacarídeos. Neste caso, se o dímero não se acumula no meio de cultura a ponto de causar repressão catabólica, ocorreria o aumento do nível de enzima, REESE (1972).

Uma das maneiras de se evitar este acúmulo, ou seja, impedir que o catabolismo rápido de um indutor venha a causar repressão catabólica, é lançar mão do uso de um derivado do indutor que seja lentamente metabolizado, a fim de fornecer o substrato indutor aos poucos, por um período de tempo mais prolongado. Portanto, o fornecimento contínuo de concentrações bem baixas do indutor, pode aumentar bastante o rendimento de enzima.

No entanto, o fornecimento contínuo de quantidades limitadas do indutor verdadeiro, pode não ser a razão única ou dominante para o aumento da produção de enzima, neste caso. Um segundo fator, o efeito surfactante do indutor modificado, deve ser considerado, REESE & MAGUIRE (1969). Os surfactantes podem acumular mais facilmente junto à parede celular dos microorganismos, e alterando sua permeabilidade, podem facilitar o acesso da mensagem de indução, resultando num efeito positivo no processo de indução.

Ambas as considerações poderiam explicar os resultados positivos de indução de inulinase, usando inulina previamente modificada por acoplamento covalente de substituinte acila de médio porte (C-6; caproil); ou de substituinte apolar polinuclear de grande porte (C-27; ciclopentano peridrofenantreno). Ambos os substituintes poderiam facilitar o ancoramento da molécula polimérica de polifrutose ao domínio de membrana lipoproteica, desde que a arquitetura restante da parede celular não ofereça barreira para tal ligação. A travessia da membrana

plasmática seria o próximo e decisivo passo para o aumento da indução, o que poderia ser realizado por toda a molécula de inulina ou por seus fragmentos hidrolíticos. Uma base mais satisfatória para esta hipótese poderia ser obtida pelo uso de frutooligossacarídeos de baixo peso molecular caproilados ou colesterilados. Estas informações adicionais ou conclusivas serão ainda estudadas.

Uma propriedade vantajosa do derivado caproilado em relação ao polímero nativo, é sua solubilidade em água à temperatura ambiente, visto que este último necessita de leve aquecimento para completa solubilização. Portanto, a inulina caproilada pode agir tanto como um indutor mais produtivo, como também como um surfactante devido as suas cadeias alifáticas. O quanto estas vantagens poderiam ser implementadas pela alteração da quantidade atual de resíduos caproil ligados (muito poucos considerando a magnitude dos sinais do espectro de ^{13}C -R.N.M.) será objeto de estudos posteriores.

Um experimento realizado para se verificar o efeito da combinação de inulina com ácido capróico livre, na formulação do meio de cultivo para as leveduras estudadas, resultou, de fato, em um efeito inibitório do crescimento, o que pode ser atribuído à presença do ácido capróico como ácido livre. Esta é uma indicação adicional de que o efeito positivo de indução obtido com o derivado de inulina, é devido à previa esterificação de grupos alcoólicos da inulina.

O uso de inulinas derivatizadas teve sucesso considerando-se o aumento da atividade inulolítica dos microorganismos testados. Este primeiro resultado experimental, mostrou que a predição de um indutor de inulinase ideal para um microorganismo em particular, é uma tarefa difícil, visto que organismos diferentes respondem diferentemente aos vários compostos modificados.

7.3. Indução de inulinase em bactéria sp.

O derivado caproilado de inulina, por ter apresentado considerável eficiência no processo de indução/secreção de inulinase, tanto no fungo filamentoso A. niger como nas leveduras K. marxianus testadas, foi então aplicado em um experimento preliminar com um modelo procarionte, para compara-lo com os já testados eucariontes. Uma bactéria isolada por FONTANA e col. no LQBB (HAULY et al, 1992) de tubérculos de dalias em decomposição, capaz de produzir DFA III, um dos conhecidos dianidridos de frutose, denominada de YLW devido à pigmentação amarela que desenvolve em meio de cultura sólido, foi utilizada neste experimento. A produção de DFA III “in vitro” foi significativamente acelerada quando o derivado **Cp-In** foi utilizado em substituição à inulina nativa como fonte de carbono. Repetido este estudo comparativo, mantendo-se extrato de levedura como único suplemento e variando-se a fonte de carbono entre 2% de inulina nativa (In), a mesma à 1% + 1% de caproil-inulina (In + Cp-In) e 2% de caproil-inulina (Cp-In), o resultado no crescimento bacteriano foi notável. A absorbância dos cultivos de 24h à 28°C e 100rpm foi respectivamente de 0,240, 1,900 e 2,600.

A produção de DFA III, iniciada às 32h no controle (In) foi antecipada para cerca de 12h nos meios com substrato lipofílico, e com concentração de 1,2 e 4,3 mg/ml, respectivamente para I+Cp-In e Cp-In, conforme determinado por HPLC em coluna CAC-Waters.

8. Cromatografia em coluna de Biogel P-6 de inulina, caproil-inulina e colesteril-inulina.

Este experimento foi realizado com a finalidade de determinar-se ao menos aproximadamente os pesos moleculares da inulina nativa e de seus derivados, a fim de verificar se houve alguma redução no peso molecular no processo de síntese dos derivados, devido à extrema labilidade das ligações B-1,2 do polímero de frutose.

O solvente de escolha para perfeita dissolução dos três produtos foi o dimetilsulfóxido. Foram aplicados 0,5ml de cada solução à 10mg/ml, à coluna de 9ml de Biogel P-6 pré-equilibrada com DMSO. Os perfis de eluição de cada produto foram acompanhados pela determinação de açúcares totais nas frações coletadas pelo método de fenol-sulfúrico.

A inulina nativa teve seu pico dominante de eluição determinado aos 5ml. Ambos os derivados, Cp-In e Cl-In tiveram picos de eluição aos 4,5ml. O padrão de amilose (polímero de elevado P.M.) foi eluído aos 4ml. Como utilizou-se uma peneira molecular invertida, pode-se concluir que a inulina, após sofrer o processo de derivatização, teve seu peso molecular aumentado em ambos os casos, não devendo, portanto ter sofrido degradação significativa durante estes processos de síntese.

9. Espectroscopia de Infra-vermelho

A fim de se comprovar a derivatização da inulina nativa com o grupo colesteril, foram desenvolvidos os espectros de absorção no infra-vermelho, com transformação de Fourier, para comparação entre

inulina e seu derivado Cl-In.

A fig. 13a mostra as frequências de absorção no infra-vermelho dos grupos químicos da inulina nativa: a banda larga em 3200-3500 cm^{-1} da distensão O-H; a banda de distensão C-H em 2923 cm^{-1} ; $-\text{CH}_2$ em 1430 cm^{-1} ; distensão C-O em 1080-1300; e deformação fora do plano de O-H na faixa de 915-955 cm^{-1} .

O espectro de colesteril-inulina na fig. 13b mostra outras bandas de absorção, além daquelas características da inulina nativa: na faixa de 1377-1383 cm^{-1} a banda característica de grupo metil ligado à carbono não ligado a nenhum outro grupo metil; frequências características de deformações fora do plano de C-H pertencentes a anel aromático na faixa de 650-900 cm^{-1} ; FLETT (1963).

Esta análise, portanto, forneceu dados que tornaram possível comprovar a derivatização da inulina com o grupo colesteril.

10. Espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^{13}C

No espectro de ^{13}C -R.N.M. da inulina de Dahlia nativa (fig. 14a), pode-se observar que os sinais de ressonância indicam que o polissacarídeo foi obtido em condições de considerável pureza. Os desvios químicos δ em ppm, dos carbonos das unidades de frutose, foram registrados nas regiões esperadas, GORIN(1981): C-1 / 61,6; C-2 / 103,1; C-3 / 77,6; C-4 / 75,0; C-5 / 82,0; e C-6 / 61,9ppm. Um grupo de sinais de baixa intensidade pode ser notado também, os quais são derivados da glucose da única unidade de sacarose existente numa das extremidades não redutoras da inulina: C-1 / 92,2; C-2 / 71,8; C-3 / 73,2; C-4 / 70,3; C-5 / 72,8; e C-6 / 61,6 ppm. A

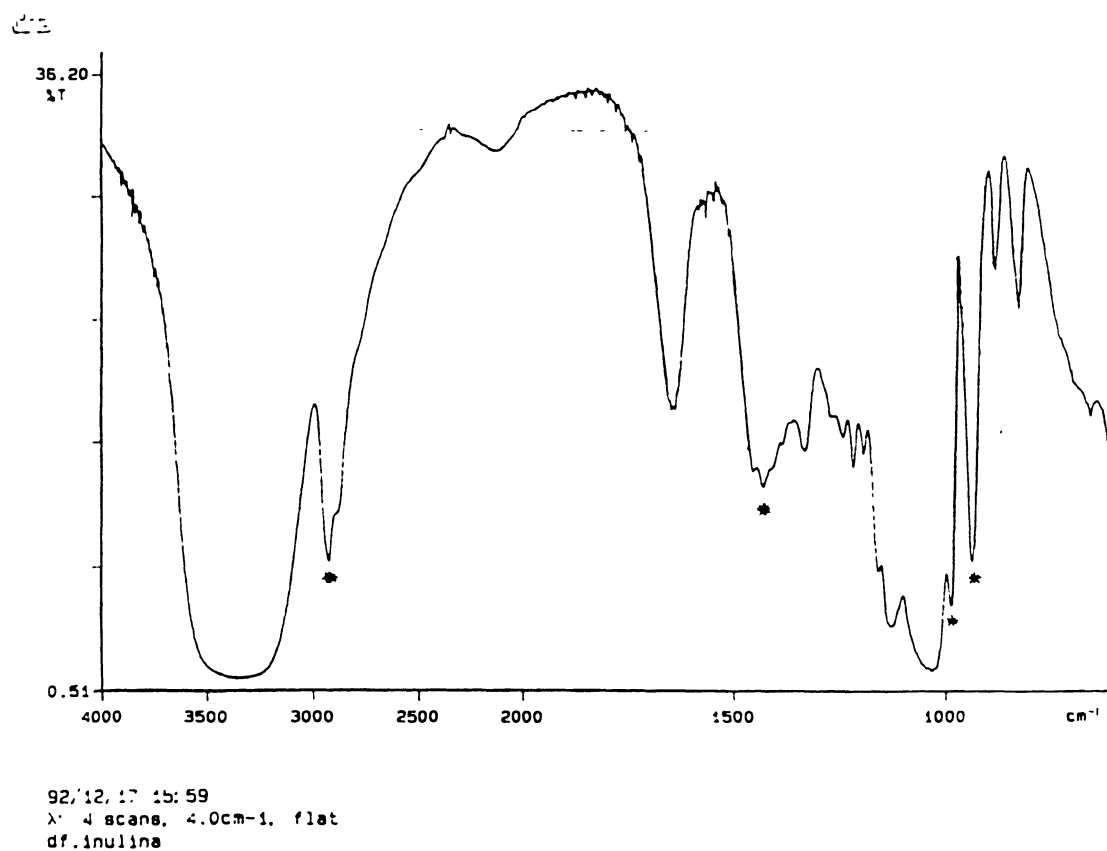


Figura 13 (a) - Espectro de infra-vermelho com transformação de Fourier (FTIR) de inulina nativa purificada, obtida de tubérculos de Dahlia.

Os asteriscos indicam as bandas típicas de absorção do polissacarídeo nativo.

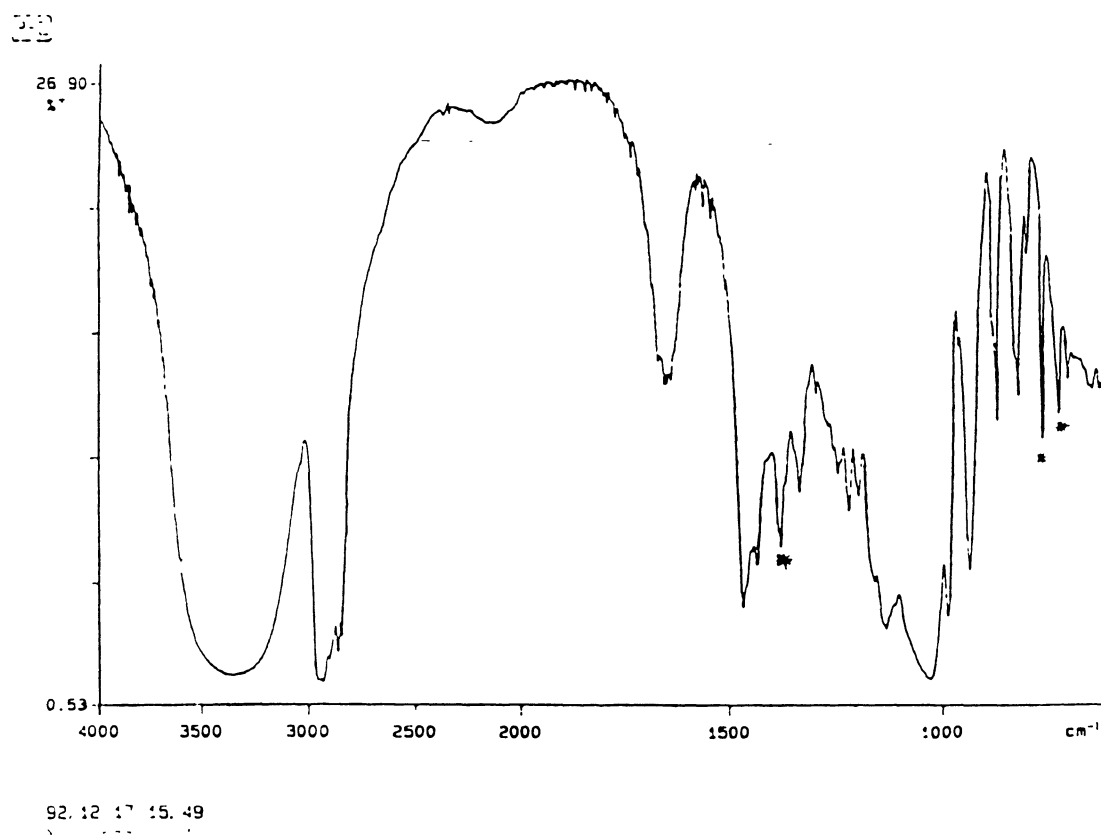


Figura 13 (b) - Espectro de infra-vermelho com transformação de Fourier (FTIR) de Colesteril-inulina (**Cl-In**).

Os asteriscos indicam as novas bandas de absorção derivadas do substituinte lipofílico inserido covalentemente no polissacarídeo nativo.

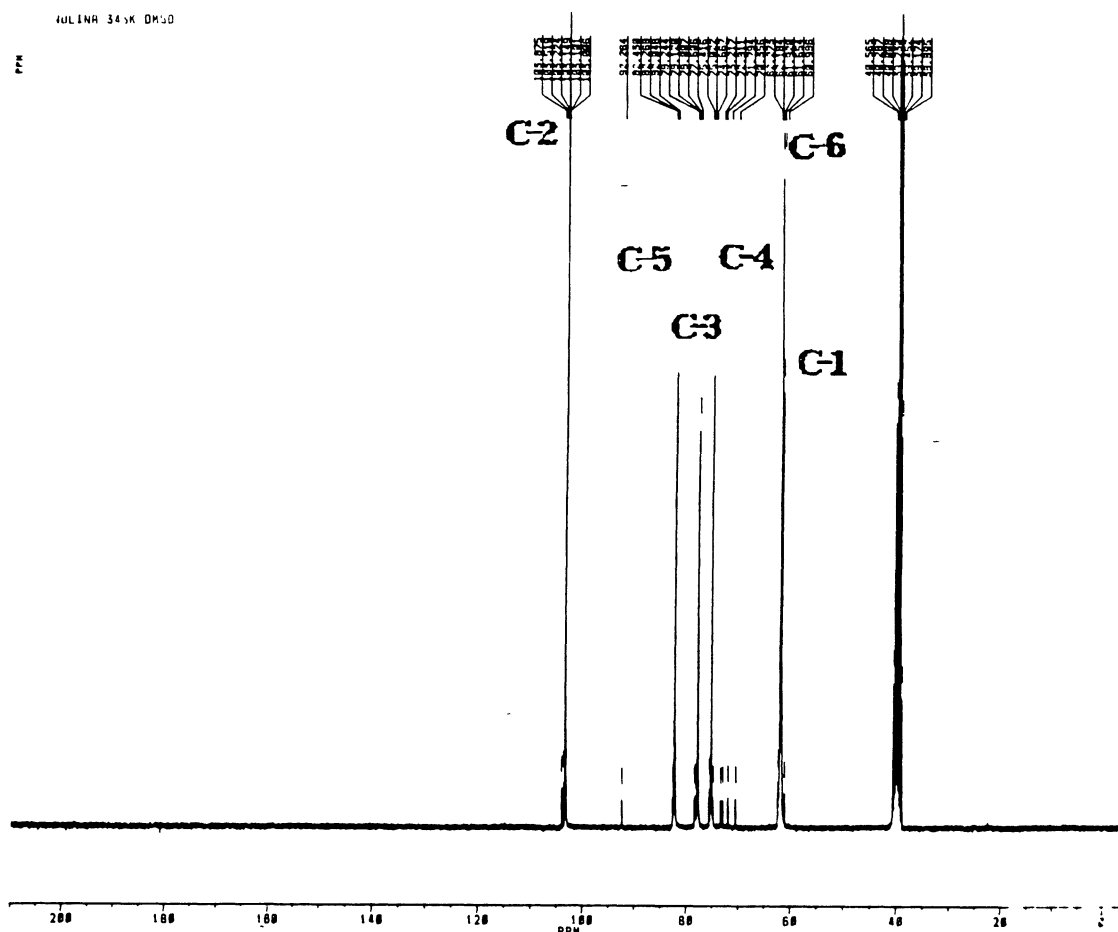


Figura 14 (a) - Espectro de ^{13}C -R.N.M. de inulina nativa
purificada, extraída de tubérculos de Dahlia

C-1 à C-6 indicam os números dos carbonos das unidades de anidrofrutofuranose do polímero, sendo as fontes dos principais sinais do espectro. O pico maior à $\delta = 40\text{ppm}$ refere-se ao DMSO-d_6 .

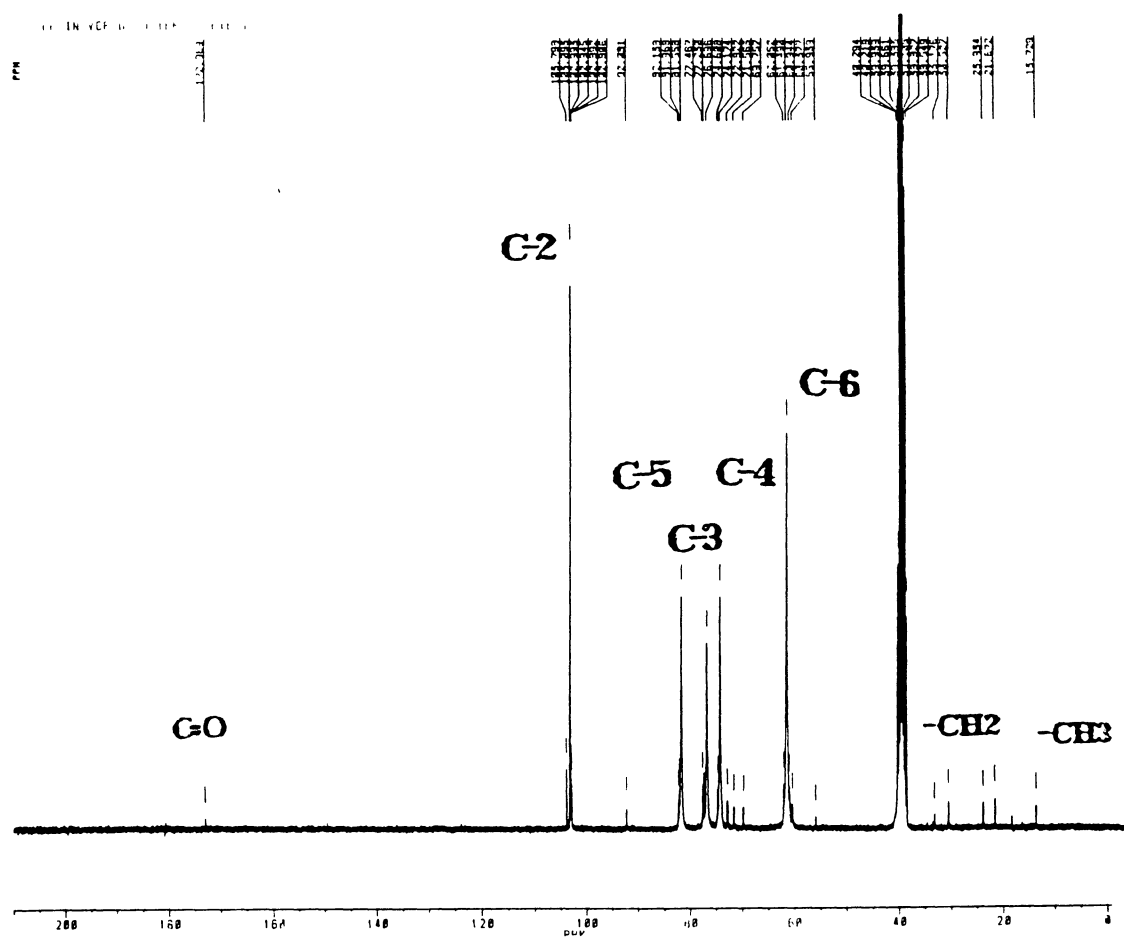


Figura 14 (b) - Espectro de ^{13}C -R.N.M. de Caproil-inulina (**Cp-In**)

$\text{C}=\text{O}$, CH_2 , e CH_3 indicam os sinais secundários do espectro, originários dos grupos químicos do substituinte caproil.

presença destes sinais nos indicam como a integridade da molécula de inulina foi mantida, nos processos de extração e purificação. Importante notar os sinais à $\delta=103,1$ e $92,2\text{ppm}$, os quais são característicos do espectro de inulina, correspondendo respectivamente ao C-2- β -frutofuranose e ao C-1- α -glucopirranose.

A análise do espectro de ^{13}C -R.N.M. do caproil-derivado de inulina (fig. 14b), nos permite observar sinais distintos nítidos em campo mais alto (à $\delta= 13,7$ à $33,1\text{ppm}$) correspondentes aos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ do resíduo de caproil; e também um sinal adicional em campo mais baixo (à $\delta= 172,9\text{ppm}$) típico de grupo carbonila da ligação éster estabelecida. Outra característica a ser notada, é que o forte emparelhamento dos sinais de C-1 e C-6 ($61,6$ e $61,9\text{ppm}$) no espectro da inulina, aparece no espectro do derivado caproilado como um único sinal. A propósito, o ponto preferencial de inserção do resíduo caproil na molécula de inulina nativa, é esperado de ocorrer num dos grupos de álcool primários, ou seja, $-\text{CH}_2\text{OH}$ do C-1 ou do C-6. Esta conclusão é também fortalecida pela mudança drástica na solubilidade em água e em solventes orgânicos apresentada pelo derivado, o qual tornou-se vantajosamente solúvel em água à temperatura ambiente.

CONCLUSÕES

1) Inulina de alto grau de pureza foi preparada a partir de raízes tuberosas de Dahlia pinnata. O mais convincente indício de uma molecularidade nativa preservada foram os sinais secundários do único resíduo glucopiranosil, diluídos nos sinais espectroscópicos dominantes da cadeia B-2,1-polifrutose como comprovado por ^{13}C -R.N.M.

2) A derivatização suave do polímero nativo foi levada a cabo com cloretos de caproíla e de colesterila, em sínteses químicas de , respectivamente, esterificação e eterificação catalisadas em meio básico.

3) Dentre os produtos visados, caproil-inulina e colesteril-inulina foram caracterizados espectroscopicamente por ^{13}C -R.N.M. e F.T.I.R. respectivamente.

4) Estes dois produtos revelaram-se eficientes indutores para a síntese/secreção de inulinases fúngicas e de leveduras.

5) O crescimento de uma bactéria inulolítica também foi acelerado pelo derivado lipofílico Caproil-inulina bem como a produção de DFA III acelerada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; RICHTMEYER, K.; HUDSON, C.S. Some enzymes present in highly purified invertase preparations; a contribution to the study of fructofuranosidases, galactosidases, glucosidases and mannosidases. J. Am. Chem. Soc., Washington, v.65, p.1369-1380, 1943.
- ADHYA, S.; ECHOLS, H. Glucose effect and the galactose enzymes of **Escherichia coli**: correlation between glucose inhibition of induction and inducer transport. J. Bacteriol., Washington, v.92, p.601-608, 1966.
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., Amsterdam, v.5, p.340, 1967.
- ARNOLD, W.N. Hydrolytic enzymes. In: BERRY, D.R.; RUSSEL, I.; STEWART, G. G. Yeast biotechnology, 2° ed. London: Allen & Unwin, p.369-391, 1987.
- AZHARI, R.; SZLAK, A.M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and characterization of endo- and exo-inulase. Biotechnol. Appl. Biochem., Duluth, v.11, n.1, p.105-117, 1989.

BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. Optimization studies for production of high fructose syrup from Jerusalem artichoke using calcium alginate immobilized cells of **Kluyveromyces marxianus**. ProcessBiochem., Rickmansworth, p.16-18, 1986.

BARKLEY, M. D.; RIGGS, A. D.; JOBE, A.; BOURGEOIS, S. Interaction of effecting ligands with lac repressor and repressor-operator complexes. Biochemistry, Washington, v.14, p. 1700-1712, 1975.

BELUCHE, I.; GUIRAUD, J.P.; GALZY, P. Inulinase activity of **Debaromyces cantarelli**. Folia Microbiol., Prague, v. 25, p.32-39, 1980.

BONNER, T.G.; HILLIER, K. The pyridine-catalysed acylation of phenols by carboxylic acid anhydrides in carbontetrachloride: Hammett, Bronsted, and Taft relationships as evidence for general base catalysis. J. Chem. Soc. Perkin II, Cambridge, v. 14, p.1828-1833, 1973.

DAMP, P. Growing dahlias. Croom Helm: London, 1981, 139p.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. Data for biochemical research., 3^a ed., Oxford: Clarendon, 580p., 1991.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. Data for biochemical research, 3^a ed., Oxford: Clarendon, 580p., 1991.

DE CROMBRUGGHE, B.; PERLMAN, R.L.; VARMAS, H. E.; PASTAN, I. Regulation of inducible enzyme synthesis in **Escherichia coli** by cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. J.Biol. Chem., Baltimore, v. 244, p.5828-5855, 1969.

DE CROMBRUGGHE, B.; BUSBY, S.; BUC, H. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. Science, Washington, v. 224, p. 831-838, 1984.

DEMAIN, A.L. Theoretical and Applied aspects of enzyme regulation and biosynthesis in microbial cells. Biotechnol. Bioeng.Symp., New York, v.3, p.21-32, 1972.

DOUWSTRA, J.J.H. Applications of HMF and its derivatives. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON FOOD NON-FOOD APPLICATIONS OF INULIN AND INULIN-CONTAINING CROPS. Books of abstracts. The Netherlands, 1991.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., Washington, v.28, p.350-356, 1956.

EDELMAN, J.; BACON, J. S. D. The action of a hydrolytic enzyme system from **Helianthus tuberosus** L. on carbohydrates present in tubers. Biochem. J., London, v. 49, p.446-453, 1951.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The metabolism of fructose polymers in plants. Biochem. J., London, V.93, p.148-161, 1964.

ESMON, P.C.; ESMON, B.; SCHAUER, I.E.; TAYLOR, A.; SCHEKMAN, R. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. J.Biol. Chem., Baltimore, v. 262, p. 4387-4394, 1987.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of Aspergillus ficuum. Appl. Microbiol. Biotechnol., Heidelberg, v. 26, p. 13-20, 1987.

FEATHER, M.S. Carbohydrate dehydration reactions that affect food quality. In: BIRCH, G.G.; SHALLENBERGER, R.S. Developments in food carbohydrate-1. New York: A.S.P., p. 153-167, 1977.

FLETT, M.St.C. Characteristic frequencies of chemical groups in the infra-red. New York: Elsevier, 98p., 1963.

FLOOD, A.E.; RUTHERFORD, P.P.; WESTON, E.W. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on enzyme systems in

Jerusalemartichoke tubers and chicory roots. Nature, London, v.214, p.1049, 1967.

FUCHS, A.; de BRUIJN, J.M.; NIEDEVELD, C.J. Bacteria and yeasts as possible candidates for the production of inulinases and levanases. Antonie Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 51, p.333-351, 1985.

FUCHS, A. Potential for non-food utilization of fructose and inulin. Stärke, Weinheim, v. 39, p. 335-343, 1987.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. Introduction to plant biochemistry. 2° ed. Oxford: Pergamon Press., p.261-263, 1983.

GORIN, P.A.J. Carbon-13 Nuclear Resonance Spectroscopy of polysaccharides. Adv. Carbohidr. Chem. Biochem., San Diego, v.38, p.72, 1981.

GROOTWASSINK, J.W.D.; FLEMING, S.E. Non-specific fructofuranosidase (inulinase) from **Kluyveromyces fragilis** : batch and continous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. Enzyme Microbiol. Technol., Stoneham, V.2, P.45-53, 1980.

GROOTWASSINK, J.W.D.; HEWITT, G.M. Inducible and constitutive formation of B-fructofuranosidase (Inulase) in batch and continous cultures of the yeast **Kluyveromyces**

fragilis. J.Gen. Microbiol., Reading, v. 129, p. 31-41, 1983.

GUIRAUD, J.P.; CAILLAUD, J.M.; GALZY, P. Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes. Eur. J. Appl. Microbiol.Biotechnol., Berlin, v. 14, p.81-85, 1982.

HALLFRISH, J. Metabolic effects of dietary fructose. FASEB J., Bethesda, v.4, p.2652-2660, 1990.

HARAGUCHI, K.; KISHIMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; NAGATA, I. Preparation of DFA III with **A. globiforms**. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. J.P. 62, 275, 694 [87, 275, 694], 1988.

HAULY, M.C.O. Inulina de Dalia : Extração e avaliação da hidrólise e dos efeitos biológicos dos subprodutos. Curitiba, 1991. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.

HAULY, M.C.O.; BRACHT, A.; BECK, R.; FONTANA, J.D. Fructose and fructose anhydrides from **Dahlia** inulin. Appl. Biochem.Biotechnol., Clifton, v. 34/35, p. 297-308, 1992.

HEWITT, G.M.; GROOTWASSINK, J.W.D. Simultaneous productions of inulase and lactase in batch and continuous cultures of **Kluyveromyces fragilis**. Enzyme Microb. Technol., Stoneham, v.6, p.263-270, 1984.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., London, v. 3, p.318-356, 1961.

JOHNSON, J.M.; HARRIS, C.H.; BARBEAU, W.E. Effects of high-fructose corn syrup replacement for sucrose on browning, starch gelatinization, and sensory characteristics of cakes. Cereal. Chem., St. Paul, v.66, n.3, p.155-157, 1989.

KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; UHM, T.B. Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethyl cellulose. Enzyme Microb. Technol., Stoneham, v.4, p.239-244, 1982.

KOSARIC, N.; WIECZORECK, A.; COESENTINO, G.P.; DUVNJAK, Z. Industrial processing and products from the Jerusalem artichoke. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., Berlin, v.32, p.2-21, 1985.

KULP, K.; LORENZ, K.; STONE, M. Functionality of carbohydrate ingredients in bakery products. Food Technol., Chicago, v.45, p.136-142, 1991.

LAM, K.S.; GROOTWASSINK, W.D. Efficient non-killing extraction of B-D-fructofuranosidase (an exo-inulase) from **Kluyveromyces fragilis** at high cell-density. Enzyme Microb. Technol., Stoneham, v. 7, p.239-242, 1985.

- LEWIS, B.A.; SMITH, F. Sugar and derivatives. In: STAHL, E. Thin-layer chromatography : a laboratory handbook. 2ed. New York: Egon Stahl, p.807-837, 1969.
- LUGHT, J.P. van der; BESEMER, A.C.; DODDEMA, H.J. The enzymatic synthesis of hydroxymethylfurfural (HMF) esters. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON FOOD AND NON-FOOD APPLICATIONS OF INULIN AND INULIN-CONTAINING CROPS. Books of abstracts, The Netherlands, 1991.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol., Washington, v.79, p. 816-826, 1960.
- MANZONI, M.; CAVAZZONI, V. Extracellular inulinase from four yeasts. Lebensm. Wiss. u. Technol., v.21, p.271-274, 1988.
- Mc DONALD, E.J.. The polyfructosans and difructose anhydrides. Adv. Carbohydr. Chem., New York, v.2, p.253-277, 1946.
- MORRISON, R.; BOYD, R. Química Orgânica. 7ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.805, 1973.
- MUKHERJEE, K.; SENGUPTA, S. Microbial inulinases and their potential in the saccharification of inulin to fructose. J.Sci. & Ind. Res., India, v.48, p.145-152, 1989.

NAKAMURA, T.; HOASHI, S.; NAKATSU, S. Culture conditions for inulase production by **Aspergillus**. J. Agric. Chem. Soc. JPN, Tokyo, v.52, p.5-10, 1978a.

NAKAMURA, T.; KUROKAWA, T.; NAKATSU, S.; UEDA, S. Crystallization and general properties of an extracellular inulase from **Aspergillus sp.** J. Agric. Chem. Soc. JPN, Tokyo, v.53, p.13-20, 1978b.

NAKAMURA, T.; MARUKI, S.; NAKATSU, S.; UEDA, S. General properties of an extracellular inulase from **Aspergillus sp.** J. Agric. Chem. Soc. JPN, Tokyo, v. 52, p.33-39, 1978c.

NEGORO, H. Inulase from **Kluyveromyces fragilis**. J. Ferment. Technol., Osaka, v.56, n.2, p.102-107, 1978.

NEGORO, H.; KITO, E. Fructofuranosidase from **Candida kefyri**. J. Ferment. Technol., Osaka, v. 51, n.2, p.96-102, 1973a.

NEGORO, H.; KITO, E. Purification and enzymatic properties of intracellular B-fructofuranosidase from **Candida kefyri**. J. Ferment. Technol., Osaka, v. 51, p.103-110, 1973b.

PAREKH, S.R.; MARGARITIS, A. Inulinase (β - fructofuranosidase) production by Kluyveromyces marxianus in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. v.22, p. 446-448, 1985.

PAREKH, S.R.; MARGARITIS, A. Production of inulinase (B-fructanfructanohydrolase) by **Kluyveromyces marxianus**. Agric.Biol. Chem., Tokyo, v.50, n.4, p.1085-1087, 1986a.

PAREKH, S.R.; MARGARITIS, A. Continuous hydrolysis of fructans in Jerusalem artichoke extracts using immobilized nonviable cells of **Kluyveromyces marxianus**. J. Food. Sci., Chicago, v. 51, n.3, p.854-855, 1986b.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal.Biochem. Duluth, v. 83, p. 346-356, 1977.

REESE, E.T. Enzyme production from insoluble substrates. Biotechnol. Bioeng. Symp., New York, n.3, p.43-62, 1972.

REESE, E.T.; MAGUIRE, A. Surfactants as Stimulants of enzyme production by microorganisms. Appl. Microbiol., Washington, v. 17, p.242-245, 1969.

REESE, E.T.; MAGUIRE, A. Extracellular sucrose of **Aureobasidium pullulans**. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 17, p.329, 1971a.

REESE, E.T., MAGUIRE, A. Increase in cellulase yields by addition of surfactants in **Trichoderma viride**. Dev. Ind. Microbiol., Amsterdam, v. 12, p.212, 1971b.

ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; van der BAAN, A.A.;

SCHEFFERS, W.A.; van DIJKEN, J.P. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of **Kluyveromyces marxianus** CBS 6556. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 54, p.1131-1137, 1988.

ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A.; van DIJKEN, J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of **Kluyveromyces marxianus** CBS 6556. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 56, p.3337-3345, 1990a.

ROUWENHORST, R.J.; RITMEESTER, W.S.; SCHEFFERS, W.A.; van DIJKEN, J.P. Localization of inulinase and invertase in **Kluyveromyces** species. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 56, p.3329-3336, 1990b.

ROUWENHORST, R.J.; van der BAAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A.; van DIJKEN, J.P. Production and localization of B-fructosidase in asynchronous and synchronous chemostat cultures of yeasts. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v. 57, p.557-562, 1991.

RUTHERFORD, P.P.; DEACON, A.C. The mode of action of dandelion root B-fructofuranosidases on inulin. Biochem. J., London, v.129, p. 511-512, 1972.

SHAW, P.E.; TATUM, J.H.; BERRY, R.E. Acid-catalized degradation of D-fructose. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 5, p.266-273, 1967.

SNYDER, H.E.; PHAFF, H.J. Studies on a B-fructosidase (inulinase) produced by **Saccharomyces fragilis**. Antonie Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 26, p.433-452, 1960.

SNYDER, H.E.; PHAFF, H.J. The pattern of action of inulinase from **Saccharomyces fragilis** on inulin. J. Biol.Chem., Baltimore, v. 237, p.2438-2442, 1962.

STERNBERG, D.; MANDELS, G.R. Induction of cellulolytic enzymes in **Trichoderma reesei** by sophorose. J. Bacteriol., Washington, v. 139, p.761-769, 1979.

SUMMER, J.B. The determination of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 62, p.287-290, 1929.

SYKES, P. A guidebook to mechanism in organic chemistry. 6th. ed. New York : Longman Scientific & Technical, p.81, 1985.

TANAKA, K.; UCHIYAMA, T.; ITO, A. Formation of Di-D-fructofuranose 1,2 : 2,3 dianhydride from inulin by an extracellular inulase of **Arthrobacter ureafaciens**. Biochim.Biophys. Acta, Amsterdam, v. 284, p. 248-256, 1972.

UCHIYAMA, T.; NIWA, S.; TANAKA, K. Purification and properties of **Arthrobacter ureafaciens** inulinase II. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 315, p. 412-420, 1973.

VAN der WENDE, L.A. Sweetener market. Bioprocessing Technol.
v.11, n.2, p.1-2, 1989.

VANDAMME, E.J.; DERYCKE, D.G. Microbial inulinases:
fermentation process, properties and applications. Adv.
Appl. Microbiol., San Diego, v.29, p.139-176, 1983.

WELKER, N.K.; CAMPBELL, L.L. Formation of α -amylase of
Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol., Washington,
v. 86, p.681, 1963.

WHITE, C.A.; KENNEDY, J.F. The carbohydrate directed
enzymes. In: KENNEDY, J.F. Carbohydrate Chemistry.
London: Burlington House, p.343-373, 1988.

WHITE, J.S.; PARKE, D.W. Fructose adds variety to
breakfast. Cereal Foods World., St. Paul, v.34, n.5,
p.392-398, 1989.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. Purification and properties
of the B-fructofuranosidase from **Kluyveromyces**
fragilis. FEBS Lett., Amsterdam, v. 160, p.16-20,
1983.

WORKMAN, W.E.; DAY, D.F. The cell wall-associated inulinase

of **Kluyveromyces fragilis**. Antonie Leeuwenhoek, Dordrecht, v. 50, p.349-353, 1984.

YAMANE, K.; SUZUKI, M.; HIROTANI, M.; OZAWA, H.; NISIZAWA, K. Effect of nature and supply of carbon sources on cellulase formation in **Pseudomonas fluorescens** var. **cellulosa**. J. Biochem., Tokyo, v. 67, p.9, 1970.

ZITTAN, L. Enzymatic hydrolysis of inulin - an alternative way to fructose production. Stärke, Weiheim, v. 33, n.11, p.373-377, 1981.