

CARACTERIZAÇÃO DE OLIGOFRUTOSES PRODUZIDAS POR ENDO-INULINASES DE *Paenibacillus sp*

JOSÉ MIGUEL MÜLLER*

RAINER JONAS**

MARIA DE FÁTIMA CARVALHO-JONAS**

SANDRA APARECIDA FURLAN***

O objetivo deste trabalho foi separar e quantificar os produtos de hidrólise da inulina, obtidos pela ação de endo-inulinases produzidas por *Paenibacillus sp*. A inulina, polímero constituído de unidades de frutose, pode apresentar uma unidade terminal de glicose. Os produtos de hidrólise da inulina por endo-inulinases incluem conjunto extenso de diferentes compostos de estrutura $F_{(n)}$ como: inulobiose (F_2), inulotriose (F_3), inulotetraose (F_4) e compostos que contém uma molécula de glicose cuja fórmula é $GF_{(n)}$. Nesse conjunto estão: sacarose (GF),kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil nistose (GF_4). Para separar e quantificar os oligômeros foram empregadas técnicas cromatográficas em camada delgada, permeação em gel e a líquido de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos mostraram que é possível, mesmo considerando a complexidade da mistura de oligômeros presentes após a hidrólise, proceder a quantificação dos mesmos. O padrão de hidrólise, observado pela ação da endo-inulinase sobre a inulina, indicou a produção de inulotriose como o principal oligômero.

PALAVRAS-CHAVE: INULO-OLIGOSSACARÍDEOS (IOS); ENDO-INULINASE; INULOBIOSE; INULOTRIOSE; INULOTETRAOSE; CROMATOGRAFIA.

* Professor, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC (e-mail: jmu@enq.ufsc.br).

** Pesquisadores do Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig, Alemanha.

*** Professora, Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Joinville, SC.

1 INTRODUÇÃO

A inulina constitui carboidrato de reserva de plantas como, Chicória (*Cichorium intybus*), Alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*), Dália (*Dahlia pinnata*) e Yacon (*Polymnia sonchifolia*), entre outras. A inulina e seus produtos apresentam propriedades benéficas ao organismo, atuando como fibra alimentar e prebiótico. Muitos estudos mostraram que a administração desses produtos melhora a flora intestinal, resultando em alívio de constipação, melhoria da composição de lipídios do sangue e supressão da produção de substâncias putrefativas no trato intestinal (ROBERFROID, 2005). São ideais para diabéticos, não apresentam efeito carcinogênico e sua ingestão diária pode diminuir os níveis de colesterol (FIORDALISO, 1995), melhorar a absorção de cálcio e minimizar o risco de desenvolvimento de lesões cancerosas no cólon (ROBERFROID, 2000).

Sob o ponto de vista estrutural, a inulina pode ser considerada como polímero de frutose (F) em cuja estrutura pode estar presente uma molécula terminal de glicose (G). Desta forma, os compostos GF_n e F_n são incluídos sob a mesma nomenclatura e apresentam-se como mistura de polímeros e oligômeros que são caracterizados pelos graus de polimerização médio e máximo (ROBERFROID, 2005).

A hidrólise parcial da inulina mediante exo-inulinases (EC 3.2.1.80), combinação de exo- e endo-inulinases, ou endo-inulinases (EC 3.2.1.7) produz conjunto de oligossacarídeos, comumente reportados como inulo-oligossacarídeos (IOS), fruto-oligossacarídeos (FOS), oligofrutanas ou oligofruloses. Os produtos da hidrólise por endo-inulinases incluem compostos do tipo F_n como, inulobiose ($n=2$), inulotriose ($n=3$) e inulotetraose ($n=4$) e compostos do tipo $GF_{(n)}$, como, sacarose ($n=1$), kestose ($n=2$), nistose ($n=3$) e frutofuranosil nistose ($n=4$). A hidrólise completa da inulina por exo-inulinases resulta na formação de glicose e frutose (ROBERFROID, 2005).

Pode-se constatar interesse crescente na identificação e estudo de microrganismos que produzem essas enzimas, especialmente os produtores de endo-inulinases (NAKAMURA *et al.*, 1997), (CHO *et*

al., 2001a), (ZHENGYU *et al.*, 2005), na avaliação das condições de produção dessas enzimas (GERN *et al.*, 1999) e meios de cultura para aumentar rendimentos e/ou diminuir custos (GILL *et al.*, 2003), além do estudo de sistemas reacionais de produção de IOS com enzimas livres ou imobilizadas (CHO *et al.*, 2001b).

A caracterização dos produtos obtidos pela hidrólise enzimática também tem merecido atenção. Na literatura encontram-se trabalhos sobre a separação e quantificação de oligômeros obtidos a partir da ação de endo-inulinases. A separação e purificação de inulotriose foi realizada por DE BRUYN *et al.* (1992), utilizando técnicas de cromatografia de troca iônica. YOKOTA, YAMAUCHI e TOMITA. (1995) reportaram a quantificação dos produtos de hidrólise da inulina (até DP=4) pela ação de endo-inulinases. L'HOMMEA *et al.* (2001) estudaram a quantificação de oligofrutanas em alimentos usando colunas de troca iônica associadas com detectores amperométricos.

Neste trabalho foram separadas e quantificadas as oligofruoses (Fn e GFn), obtidas a partir da ação de endo-inulinases produzidas por *Paenibacillus* sp. sobre a inulina. O conjunto de oligômeros foi separado mediante técnicas cromatográficas em camada delgada, permeação em gel e a líquido de alta eficiência (CLAE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Para as reações de hidrólise empregou-se inulina pura (Sigma) e para a separação dos oligômeros meio, parcialmente fermentado, isento de oligômeros do tipo GFn. Para as curvas de calibração foram utilizadas frutose (Merck) e Neosugar (Meiji Seika Kaisha).

2.2 PREPARAÇÃO DA ENZIMA

Utilizou-se o microrganismo *Paenibacillus* sp CDB 003. A composição do meio de cultura em (g/L) foi: inulina (5,0), extrato de levedura (0,5), KH_2PO_4 (0,7), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,9), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(0,2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5) e micronutrientes (1 mL/L). A composição dos micronutrientes incluiu (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0), H_3BO_4 (1,0); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,45); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,3); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,3); CuSO_4 (0,1); KI (0,1); $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04). Realizou-se o processo fermentativo em fermentador de bancada (MD-Braun – 6 litros) por 48 horas a 50°C. O meio fermentado foi centrifugado e filtrado para a separação de células, sendo o extrato resultante utilizado nas reações de hidrólise.

2.3 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE

Na separação e identificação dos produtos de hidrólise foram empregadas técnicas cromatográficas em camada delgada, permeação em gel e a líquido de alta eficiência (CLAE) (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1990).

2.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As amostras (30 μL) foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada, Kieselgel 60 F254, usando-se como fase móvel mistura contendo ácido acético: clorofórmio: água na proporção de 21:18:3 (v/v).

2.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (CPG)

A amostra (50 mL) foi liofilizada e aplicada em coluna de permeação em gel (Sephadex G15-Pharmacia, 700 mm x 16 mm), com fluxo de 0,1-0,2 mL/min. As frações coletadas (400 μl) foram aplicadas em CCD, reunidas de acordo com seu constituinte principal e recromatografadas.

2.3.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras foram aplicadas em coluna de troca iônica (Polispher CHNA). As condições operacionais do cromatógrafo (Merck-Hitachi) foram: temperatura de 70°C e água (0,4 mL/min) como fase móvel.

Monitorou-se a eluição dos picos com detector de índice de refração (Merck-Hitachi). As curvas de calibração para quantificação dos oligômeros foram efetuadas para frutose e Neosugar.

2.4 REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Realizou-se a hidrólise enzimática utilizando inulina (6%) em tampão fosfato 100 mM/L, pH 6,0, a temperatura de 50 °C por 5 horas. Os compostos puros (Fn) foram submetidos à hidrólise ácida, usando-se HClO_4 0,3 mol/L a 95 °C durante 15 minutos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O microrganismo utilizado para produção de endo-inulinase foi isolado a partir do solo e identificado como *Paenibacillus* sp pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig – Alemanha. Algumas características do microrganismo incluem a formação de esporos, a utilização de açúcares (como frutose, glicose, arabinose e xilose) e capacidade de crescimento a 55°C. O microrganismo apresentou capacidade de crescimento em meios de cultura contendo inulina como única fonte de carbono.

Nos experimentos preliminares observou-se a presença de oligômeros de frutose no meio de cultura durante o processo fermentativo, indicando que o microorganismo degradou a inulina extracelularmente.

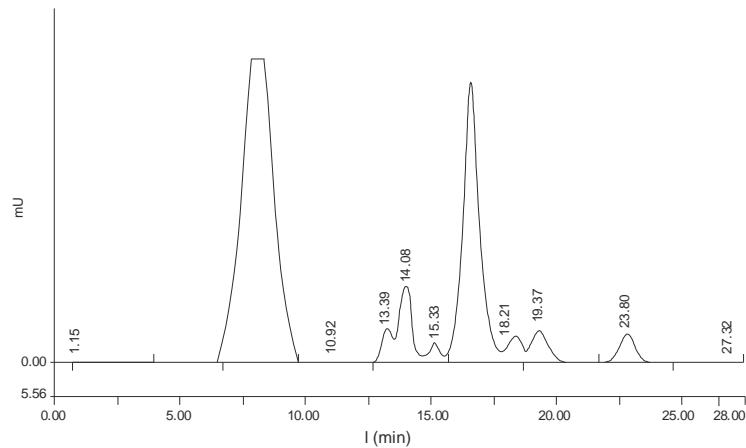
As fermentações para produção de endo-inulinases foram realizadas a 50°C durante 48 horas. O meio de cultura, centrifugado na primeira etapa de purificação, foi seqüencialmente filtrado para remoção completa de partículas e outros resíduos presentes.

A hidrólise parcial da inulina, ou mais especificamente a ação de endo-inulinases em sua estrutura, produz mistura de oligômeros com estrutura GFn. Os primeiros da série são sacarose ($n=1$) e kestose ($n=2$), e os primeiros oligômeros com a estrutura Fn são inulobiose ($n=2$) e inulotriose ($n=3$). O padrão de hidrólise da molécula de inulina

produz também pequena quantidade de monossacarídeos, sendo que a frutose aparece em maior concentração. A quantidade de cada um desses compostos na mistura, após a hidrólise enzimática, depende do grau de polimerização da inulina utilizada e do padrão de hidrólise característico da(s) enzima(s).

O perfil cromatográfico da hidrólise da inulina, obtido com o extrato enzimático bruto produzido por *Paenibacillus* sp (Figura 1), inclui o conjunto de inulo-oligômeros das séries Fn e GFn. O principal oligômero formado no processo de hidrólise foi inulotriose.

FIGURA 1 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA INULINA POR ENDO-INULINASE DE *Paenibacillus* sp



Durante a hidrólise também foi produzida frutose, produto característico da ação de exo-inulinases na inulina, cuja presença pode ser explicada pelo padrão de hidrólise enzimática em que moléculas de frutose em posição terminal podem ser liberadas. Esse comportamento foi reportado por YOKOTA *et al.* (1995), indicando que no primeiro estágio da hidrólise houve produção de inulotetraose como produto principal. Esse oligômero, seqüencialmente hidrolisado pela ação de endo-inulinases produziu inulotriose e frutose.

Na Tabela 1 estão listados os constituintes eluídos em CLAE e seus respectivos tempos de retenção. Os tempos de retenção dos oligômeros de estrutura GF_n foram obtidos a partir da análise de uma amostra de Neosugar, cujos constituintes principais são kestose e nistose.

TABELA 1 - CONSTITUINTES DA MISTURA DE OLIGÔMEROS, RESPECTIVOS GRAUS DE POLIMERIZAÇÃO E TEMPOS DE RETENÇÃO

Composto	Grau de polimerização (GP)	Tempo de retenção
nistose	4	13,39
inulotetraose	4	14,08
kestose	3	15,33
inulotriose	3	16,53
sacarose	2	18,21
inulobiose	2	19,37
frutose	1	23,80

Já foram reportadas algumas possibilidades para quantificar os oligômeros que basicamente utilizam a técnica de permeação em gel, ou de troca iônica, diferindo nas soluções utilizadas para eluição e nos dispositivos de detecção. O desempenho da separação em coluna de troca iônica para o conjunto dos oligômeros produzidos (até GP = 5) mostrou-se satisfatório quando foi utilizada a coluna Polispher CHNA da Merck.

A separação das oligofrutoses de estrutura F₂, F₃ e F₄, foi facilitada pela obtenção de mistura sem os compostos GF(n). Nas fermentações para produção de endo-inulinases observou-se que o substrato (inulina) foi hidrolisado em oligômeros, sendo que o microrganismo utilizado no processo fermentativo metabolizou preferencialmente os oligômeros que continham a molécula de glicose em sua estrutura. Desta forma, a partir de meios de cultura parcialmente fermentados, foi possível obter solução contendo somente os oligômeros de estrutura F_n. A solução contendo os oligômeros de estrutura F_n foi liofilizada e aplicada em coluna de cromatografia de permeação em gel. A eluição dos oligômeros foi monitorada reunindo-se as frações contendo inulobiose, inulotriose e inulotetraose de acordo com seu constituinte principal.

As frações foram novamente lyophilizadas e analisadas por CPG.

A Figura 2 apresenta os resultados da CCD de amostras hidrolisadas, dos oligômeros purificados e de amostra constituída de oligômeros GF(n). No ponto A aplicou-se a amostra obtida a partir da ação de endo-inulinases produzidas por *Paenibacillus* sp sobre a inulina, podendo ser visualizados em maior proporção os oligômeros inulotetraose e inulotriose. Os oligômeros purificados por CPG foram aplicados seqüencialmente nos pontos B, C e D correspondendo a inulobiose, inulotriose e inulotetraose, respectivamente. A mistura de oligômeros do tipo GF(n) em que nistose e kestose correspondem a 88,5%, contendo também frutofuranosil nistose, sacarose, glicose e frutose foi aplicada no ponto E. Os oligômeros do tipo GF2 e GF3 também estão presentes na amostra aplicada no ponto A, entretanto, a sobreposição com os oligômeros F3 e F4 produz uma única mancha na CCD.

FIGURA 2 - ANÁLISE DE OLIGÔMEROS F_n E GF_n (PONTOS DE APLICAÇÃO A, B, C, D e E) POR CCD



F = frutose, **F2** = Inulobiose, **F3** = inulotriose, **F4** = inulotetraose, **GF2** = kestose, **GF3** = nistose. **A** = IOS da hidrólise enzimática da inulina por endo-inulinases de *Paenibacillus* sp. **B,C e D** = oligômeros purificados e **E** = Neosugar.

Os oligômeros puros foram submetidos à hidrólise ácida (HClO_4 , 0,3 M) e a quantificação da frutose formada permitiu determinar a concentração das oligofrutanas purificadas a partir das relações estequiométricas para inulobiose: $\text{F}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{F}$, inulotriose: $\text{F}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{F}$ e inulotetraose: $\text{F}_4 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{F}$.

A partir dos resultados obtidos foi possível a quantificação dos produtos de hidrólise da inulina por endo-inulinases até GP 4, utilizando-se os oligômeros F2, F3 e F4 purificados como padrão. Adicionalmente, a quantificação dos compostos com estrutura GF_n foi efetuada com a utilização de padrão de Neosugar que contém somente esses oligômeros.

Para o cromatograma apresentado na Figura 1, as concentrações dos produtos obtidos foram (g/L): inulina (2,77); GF₃ - nistose (0,17); F₄ - inulotetraose (0,43); GF₂ – kestose (0,08); F₃ – inulotriose (1,63); GF – sacarose (0,08); F₂ - inulobiose (0,23) e F - frutose (0,23).

4 CONCLUSÃO

Considerando o padrão de hidrólise obtido a partir de enzimas produzidas por *Paenibacillus* sp, que tem a inulotriose como principal oligômero, pode-se afirmar que esse microrganismo representa boa alternativa para a produção de endo-inulinases. O perfil de hidrólise indicou também que o microrganismo não produz enzimas do tipo exo, dispensando etapas de separação e purificação das enzimas.

A coluna de troca iônica utilizada neste trabalho mostrou-se adequada para separar os produtos obtidos na hidrólise enzimática. A resolução de separação, obtida para oligômeros com a mesma massa molar e grau de polimenização até 5, não foi encontrada na literatura consultada. Na maioria dos trabalhos os produtos com a mesma massa molar (como inulobiose e sacarose) são quantificados conjuntamente, desconsiderando que a proporção entre eles na mistura afeta o índice de refração e consequentemente modifica as concentrações medidas.

A constatação de que a partir de meios parcialmente fermentados podem ser obtidos oligômeros com estrutura Fn na faixa dos produtos de maior interesse apresentou-se como estratégia interessante. Essa possibilidade permitiu quantificar separadamente compostos com a mesma massa molar como, por exemplo, inulobiose e sacarose.

Os oligômeros purificados do tipo Fn: inulobiose, inulotriose e inulotetraose, juntamente com o padrão de oligômeros do tipo GF_n possibilitaram a quantificação dos principais produtos de hidrólise da inulina por endo-inulinases de *Paenibacillus* sp.

Abstract

CHARACTERIZATION OF OLIGOFRUCTOSES PRODUCED BY ENDO-INULINASES FROM Paenibacillus sp

The objective of this study was to separate and quantify inulin hydrolysis products obtained through the action of endo-inulinases from *Paenibacillus* sp. Inulin is a biopolymer composed of fructose units with one terminal unit of glucose. The products of inulin hydrolysis by endo-inulinases include a large number of different compounds with an F_(n) structure, as, inulobiose (F₂), inulotriose (F₃), inulotetraose (F₄), and compounds GF(n) containing one glucose molecule. In this group are: sucrose (GF), kestose (GF₂), nystose (GF₃) and fructofuranosyl nystose (GF₄). For the oligomer separation and quantification, thin layer chromatography (TLC), gel permeation chromatography (GPC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were employed. The results showed that despite the complexity of the mixture obtained after hydrolysis it is possible to quantify the products. The observed hydrolysis pattern by the endo-inulinases action produced inulotriose as the main oligomer.

KEY-WORDS: INULOOLIGOSACCHARIDES (IOS); INULOBIOSE; INULOTRIOSE; INULOTETRAOSE; ENDOINULINASES; CHROMATOGRAPHY.

REFERÊNCIAS

- 1 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1990.
- 2 CHO, Y.J.; SINHA, J.; PARK, J.P.; YUN, J. Y. Production of

inulooligosaccharides from chicory extract by endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 439–445, 2001a.

- 3 CHO, Y.J.; SINHA, J.; PARK, J.P.; YUN, J. Y. Production of inulooligosaccharides from inulin by a dual endoinulinase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 428–433, 2001b.
- 4 DE BRUYN, A.; ALAVAREZ, A. P.; SANDRA, P.; DE LEENHEER, L. Isolation and identification of O- β -D-fructofuranosyl-(2,1)-O- β -D-fructofuranosyl-(2,1)-D-fructose, a product of the enzymic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. **Carbohydrate Research**, v. 235, p. 303-308, 1992.
- 5 FIORDALISO, M.; KOK, N.; DESAGER, J.; GOETHALS, F.; DEBOYSER, D.; ROBERFROID, M.; DELZENNE, N. Dietary oligofructose lowers triglycerides, phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats. **Lipids**, v.30, p. 163-167, 1995.
- 6 GERN, R. M. M.; CARVALHO-JONAS, M. F.; NINOW, J. L; FURLAN, S. A. Estudo da influência da inulina comercial por extrato de chicória na produção de endo-inulinase. In SYMPOSIUM ON ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS, 6. SHEB, Maringá, 1999. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1999.
- 7 GIL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 359–362, 2003.
- 8 L'HOMMEA, C.; PESCHETB, J.L.; PUIGSERVERAA.; BIAGINIA A. Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 920, p. 291–297, 2001.
- 9 NAKAMURA, T.; SHITARA, A.; MATSUDA, S.; MATSUO, T.; SUIKO, M.; OTHA, K. Production, purification and properties of

an endoinulinase of *Penicillium sp* that liberates inulotriose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 313-318, 1997.

- 10 ROBERFROID, M. B. Inulin type fructans: functional foods ingredients In: INULIN: origin, chemistry, biochemistry, and technological properties. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005.
- 11 ROBERFROID, M. B. Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal Tract. **Nutrition**, v. 16, p. 677 - 679, 2000.
- 12 YOKOTA, A.; YAMAUCHI, O.; TOMITA, F. Production of inulotriose from inulin by inulin-degrading enzyme from *Streptomyces rochei* E87. **Let. App. Microb.**, v.21, p. 330-333, 1995.
- 13 ZHENGYU, J.; JING, W.; BO, J.; XUEMING, X. Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. **Food Research International**, v. 38, p. 301–308, 2005.