

## PRODUÇÃO DE ISOMALTULOSE, UM SUBSTITUTO DA SACAROSE, UTILIZANDO GLICOSILTRANSFERASE MICROBIANA

Haroldo Yukio Kawaguti\* e Hélia Harumi Sato

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 11/10/06; aceito em 4/5/07; publicado na web em 19/12/07

ISOMALTULOSE PRODUCTION, A NEW SUCROSE SUBSTITUTE, USING MICROBIAL GLUCOSYLTRANSFERASE. Isomaltulose, a functional isomer of sucrose, is a non-cariogenic reducing disaccharide; has a low glycemic index; selectively promotes growth of beneficial bifidobacteria in the human intestinal microflora; and has greater stability than sucrose in some foods and beverages. Isomaltulose is a nutritional sugar that is digested more slowly than sucrose, and has health advantages for diabetics and nondiabetics. Immobilization techniques, especially entrapment of the cells, are widely used for conversion of sucrose into isomaltulose. Immobilization offers advantages such as minimum downstream processing, continuous operation and reusability of cells. Isomaltulose is currently considered to be a promising sugar substitute.

Keywords: glucosyltransferase; isomaltulose; immobilized cells.

### INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos está constantemente à procura de novos ingredientes para melhorar os produtos existentes ou para introduzir novos produtos no mercado. A sacarose é o adoçante mais utilizado na produção de alimentos devido às suas características físico-químicas e sensoriais. No entanto, devido ao alto valor calórico e às propriedades cariogênicas da sacarose, adoçantes alternativos têm sido pesquisados. O Brasil é o maior produtor mundial de sacarose, com uma produção estimada em 29,2 milhões de t para a safra 2006/07<sup>1</sup> e diversos produtos de interesse industrial podem ser obtidos a partir da sacarose como, por exemplo, açúcar invertido, dissacarídeos (isomaltulose e trealulose), frutooligosacarídeos, polissacarídeos (goma xantana e dextrana), etanol, ácido glutâmico, ácido cítrico etc.

Nas últimas duas décadas houve um crescente aumento no interesse da produção de isomaltulose, também conhecida como Palatinose® ou Lylose®, de ocorrência natural no mel e na cana-de-açúcar em pequenas quantidades, e tem sido considerada um promissor substituto da sacarose. A isomaltulose é um dissacarídeo redutor, isômero da sacarose, obtida por conversão enzimática microbiana a partir da sacarose<sup>2,3</sup>. Pesquisas envolvendo a produção de isomaltulose iniciaram-se no Japão entre 1970-75<sup>4</sup>. A isomaltulose possui um sabor adocicado suave, apresentando cerca de 50% da doçura da sacarose<sup>5-9</sup>, tem propriedades físico-químicas e sensoriais muito similares e, quando utilizada em alimentos, como substituto da sacarose em confeitos e chocolates, não foi notada diferença na doçura<sup>9-11</sup>.

A isomaltulose possui baixo potencial cariogênico, sendo utilizada comercialmente no Japão como ingrediente e substituinte da sacarose na produção de gomas de mascar, iogurtes, doces e bebidas<sup>9</sup>. Apresenta também baixa velocidade de hidrólise e formação de monossacarídeos no organismo, sendo recomendada para aplicação em alimentos e bebidas destinados a diabéticos e esportistas<sup>3</sup>. A produção mundial de isomaltulose foi estimada em 60.000 t/ano<sup>12</sup>.

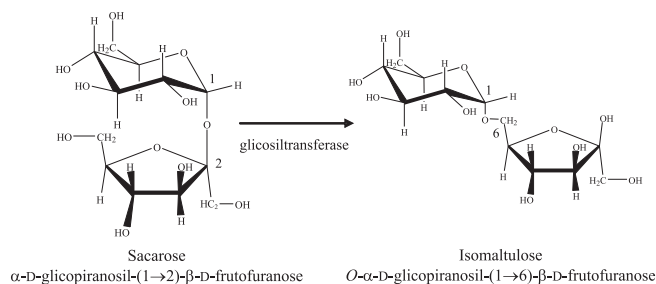
O principal derivado da isomaltulose é o isomalte, um açúcar-álcool obtido por hidrogenação com a formação de uma mistura equimolar de [6-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [6-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-manitol], de baixo valor calórico e não cariogênico. O isomalte, também conhecido como Isomalt® e Palatinit®, tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua aplicação industrial como substituto da sacarose em processamento de alimentos, sendo utilizado como adoçante dietético, não cariogênico e em formulações farmacêuticas<sup>13-15</sup>. Muitos produtos derivados da isomaltulose possuem potenciais aplicações industriais. Podem ser obtidos dissacarídeos intermediários, polímeros como detergentes biodegradáveis e surfactantes de interesse industrial<sup>12,16</sup>. Uma outra aplicação da isomaltulose consiste na obtenção de oligômeros de isomaltulose, que atuam como prebióticos, estimulando a proliferação de bifidobactérias da microbiota intestinal<sup>17</sup>.

### CONVERSÃO DE SACAROSE EM ISOMALTULOSE POR VIA MICROBIANA

A conversão de sacarose em isomaltulose por via microbiana tem atraído grande interesse comercial, pois a síntese química é muito difícil. A isomaltulose [ $\alpha$ -D-glicopiranosil-(1,6)- $\beta$ -D-frutofuranose] é obtida através da conversão enzimática da sacarose [1-*O*-( $\beta$ -D-frutofuranosil)- $\alpha$ -D-glicopiranosil], pela  $\alpha$ -glicosiltransferase, também conhecida como sacarose isomerase e isomaltulose sintase (EC 5.4.99.11), na qual a ligação 1,2-glicosídica entre a glicose e a frutose é rearranjada para ligação 1,6-glicosídica (Esquema 1).

A enzima é produzida por diversos microrganismos como *Protaminobacter rubrum*<sup>7,18-20</sup>, *Erwinia carotovora*<sup>21</sup>, *Erwinia* sp. D12<sup>22-24</sup>, *Erwinia rhapontici*<sup>10,25</sup>, *Serratia plymuthica*<sup>3,26,27</sup>, *Klebsiella planticola*<sup>9</sup> e *Klebsiella* sp.<sup>28,29</sup>. O uso de microrganismos como biocatalisadores para obtenção de determinadas substâncias tem suas vantagens, como a alta capacidade de multiplicação e alta flexibilidade de utilização, graças ao seu poder de adaptação às várias situações nutricionais, modificando seu metabolismo de acordo com a oferta de nutrientes do meio<sup>30</sup>. Entre os sistemas de produção de isomaltulose, existem os de enzima livre<sup>21,26,28,29</sup>, células livres<sup>31-33</sup> e células imobilizadas<sup>3,5,8,10,18,20,23-25,30,34-36</sup>.

\*e-mail: kawaguti@fea.unicamp.br

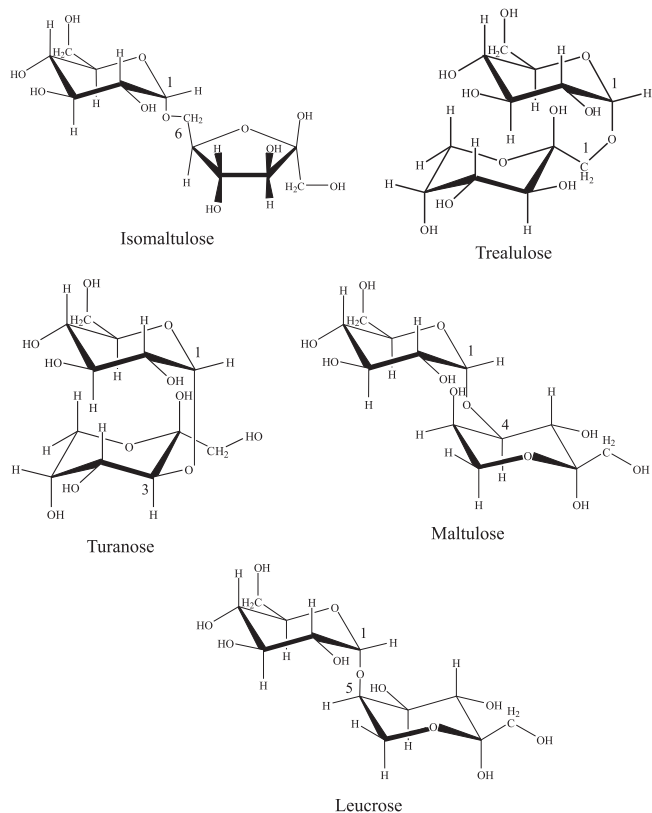


**Esquema 1.** Conversão de sacarose em isomaltulose por glicosiltransferase microbiana

### Microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose

O primeiro relato da obtenção da isomaltulose foi em 1957, quando Weidenhagen e Lorenz<sup>37</sup> relataram a conversão de sacarose em um novo e desconhecido dissacarídeo redutor pela ação da bactéria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77, isolada a partir de subprodutos de açúcar de beterraba. O dissacarídeo foi identificado como isomaltulose e nomeado como palatinose, derivado de “palatinum”, nome da província alemã onde o dissacarídeo foi encontrado. A partir deste estudo, outros trabalhos foram realizados enfocando o isolamento e cultivo de microrganismos, a produção e caracterização da enzima e a conversão de sacarose em isomaltulose. Lund e Wyatt<sup>21</sup> verificaram que a bactéria *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* GI20 produziu isomaltulose e pequenas quantidades de outros açúcares, como glicose, frutose, maltose, sacarose e seus isômeros, como turanose, maltulose, leucrose e trealulose (Figura 1).

A maioria dos microrganismos produtores de glicosiltransferase, que converte sacarose em isomaltulose, foi fermentada em meio



**Figura 1.** Isômeros da sacarose

de cultivo contendo peptona, sacarose, extrato de levedura, extrato de carne e sais. Tais componentes possuem alto custo, encarecendo a produção de isomaltulose. Alguns trabalhos têm utilizado subprodutos e resíduos agroindustriais como componentes de meio de cultivo na tentativa de diminuir o custo de fermentação. Tem-se utilizado melaço de cana-de-açúcar como substituto da sacarose como fonte de carbono, água de maceração de milho como alternativa à peptona e extrato de carne e levedura, como fonte de carbono e nitrogênio. A Tabela 1 relaciona os microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose, os meios de cultivo utilizados para a fermentação dos microrganismos e os produtos obtidos a partir de sacarose.

### Características da glicosiltransferase

A glicosiltransferase microbiana é uma enzima intracelular e está localizada no espaço periplasmático das células<sup>9,10,26,39</sup>. Não há disponibilidade comercial da glicosiltransferase para a conversão de sacarose em isomaltulose, sendo pouco os trabalhos que utilizam a enzima purificada para a conversão<sup>27,28,29,46</sup>. Diversos estudos foram realizados visando a purificação, caracterização e o esclarecimento do mecanismo bioquímico da conversão de sacarose em isomaltulose. Constatou-se que a enzima de *Erwinia rhapontici* que mediava a bioconversão de isomaltulose estava localizada no espaço periplasmático das células, o que facilitaria seu uso como um biocatalisador industrial<sup>10,39</sup>. A enzima foi descrita como sacarose específica com um mecanismo de transglicosilação intramolecular em que ambos os resíduos de glicose e frutose estavam associadas à enzima. A reação, não sendo seletiva, formava simultaneamente isomaltulose e trealulose a partir da re-glicosilação com as posições do carbono 6 e 1 da frutofuranose. Verificou-se que a razão isomaltulose/trealulose foi constante nos estágios iniciais da reação sob diferentes condições de pH, temperatura e concentração do substrato. No entanto, após extensa incubação e quando toda sacarose foi consumida, houve uma lenta queda da concentração de isomaltulose e um lento aumento da trealulose. Em outro ensaio, isomaltulose e trealulose foram incubadas com enzima purificada e células livres e verificou-se que houve formação de trealulose a partir de isomaltulose e que não houve formação de isomaltulose a partir de trealulose, sugerindo que a conversão da isomaltulose seria reversível e a da trealulose, irreversível.

As glicosiltransferases que convertem a sacarose em isomaltulose descritas na literatura apresentam atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 6,5 e temperatura de 30 a 40 °C e são citadas como sendo termossensíveis<sup>26-29,46-48</sup>. A enzima não purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 foi obtida após centrifugação a 10.000 rpm, por 20 min e rompimento da massa celular em prensa-X<sup>26</sup>. Após separação em Bio-Gel foi obtido um grau de pureza 25 vezes superior em relação à enzima não purificada, que apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 30 °C. Park *et al.*<sup>28,29</sup> caracterizaram a enzima obtida da bactéria *Klebsiella* sp capaz de converter sacarose em isomaltulose. A enzima purificada apresentou melhor atividade entre pH 6 e 6,5 e temperatura ótima de 35 °C.

A enzima denominada sacarose isomerase, clonada em *Escherichia coli* por Wu e Birch<sup>48</sup>, apresentou atividade máxima em pH 5,0 a 30 e 35 °C. A enzima purificada apresentou  $K_m$  de 39,9 mM e  $V_{max}$  de 423 U/mg para sacarose. A enzima converteu sacarose em isomaltulose e trealulose na proporção 8:1, respectivamente. A glicosiltransferase de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, que produz maior proporção de trealulose a partir de sacarose, foi purificada<sup>47</sup>. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,8 a 40 °C, e maior estabilidade na faixa de pH 5,1 a 6,7 e em temperaturas inferiores a 40 °C. A enzima purificada converteu sacarose em isomaltulose e trealulose, e a razão

**Tabela 1.** Microrganismos produtores de glicosiltransferase que convertem sacarose em isomaltulose, meios de fermentação e produtos formados

Microrganismos produtores de glicosiltransferase	Composição do meio de cultivo para fermentação do microrganismo	Rendimento (%) de isomaltulose, trealulose e outros carboidratos utilizando-se células livres, células imobilizadas ou glicosiltransferase em diferentes concentrações de sacarose
<i>Agrobacterium radiobacter</i> MX-232 <sup>38</sup>	Peptona 1%, melão 10%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3% e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 0,2%	9,9% de isomaltulose, 88,8% de trealulose e 1,4% de sacarose utilizando-se célula livres e sacarose 20%
<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC29283 <sup>36</sup>	Sacarose 5%, extrato de levedura 1% e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	89% de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 55%
<i>Erwinia rhapontici</i> NCPPB1578 <sup>39</sup>	Peptona 1%, sacarose 4% e extrato de carne 0,4%	85% de isomaltulose e 15% de trealulose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 55%
<i>Erwinia rhapontici</i> NCPPB1578 <sup>40</sup>	Caseinato de peptona 0,6%, sacarose 4%, MgNO <sub>3</sub> 0,3% e NaCl 0,5%	~46,7% de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 30%
<i>Erwinia</i> sp. <sup>41</sup>	Melão de cana-de-açúcar 15%, água de maceração de milho 2% e extrato de levedura comercial 1,5%	72,1% de isomaltulose utilizando-se células livres e sacarose 35%
<i>Erwinia</i> sp. <sup>30</sup>	Melão de cana-de-açúcar 12%, peptona 4% e extrato de carne 0,4%	50% de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 20-30%
<i>Klebsiella planticola</i> CCRC19112 <sup>9</sup>	Caldo de soja 3%, sacarose 7%, triptona bacteriológica 2% e NaCl 0,5%	76-84% de isomaltulose, 14-16% de trealulose, 2-6% de glicose e 2-3% de frutose utilizando-se células livres e sacarose 50%
<i>Klebsiella planticola</i> MX10 <sup>18</sup>	Peptona 1%, sacarose 10%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 0,2% e NaCl 0,3%	63,9% de isomaltulose, 30,2% de trealulose e 4,3% de sacarose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 20%
<i>Klebsiella</i> sp. <sup>28,29</sup>	Peptona 1%, sacarose 4% e extrato de carne 0,4%	86% de isomaltulose utilizando-se enzima purificada e sacarose 4%
<i>Klebsiella</i> sp. LX3 <sup>42</sup>	Peptona 1%, sacarose 0,4% e extrato de levedura 0,04%	87,4% isomaltulose e 11,6% de trealulose e <1% de glicose utilizando-se enzima purificada e sacarose 4%
<i>Pantoeae dispersa</i> UQ68J <sup>43</sup>	Triptona 1,2%, sacarose 4%, extrato de levedura 2,4%, glicerol 0,4% e KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,09 mol/L	80,1% de isomaltulose, 4% de trealulose, 9,7% de glicose, 4,6% de frutose e 1,6% de sacarose utilizando-se células livres e sacarose 25%
<i>Protaminobacter rubrum</i> <sup>31</sup>	Peptona 2%, sacarose 10%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 1%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4% e CaCl <sub>2</sub> 0,6%	>90% de isomaltulose utilizando-se células livres e sacarose 25%
<i>Protaminobacter rubrum</i> CBS574.77 <sup>32</sup>	Peptona 0,5%, sacarose 5%, extrato de carne 0,3% e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,01M	85,9% de isomaltulose e 8% de trealulose utilizando-se células livres e sacarose 35%
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i> MX-45 <sup>44</sup>	Peptona 1%, melão 10%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3% e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 0,2%	9,2% de isomaltulose, 88,4% de trealulose e 2,4% de sacarose utilizando-se células livres e sacarose 20%
<i>Serratia plymuthica</i> <sup>3</sup>	Peptona 1%, sacarose 5%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2% e NaCl 0,3%	79,8% de isomaltulose, 7% de trealulose, 1,2% de isomaltulose, 2,9% de glicose, 5,7% de frutose, 0,9% de sacarose e 2,6% de outros utilizando-se células imobilizadas e sacarose 40%
<i>Serratia plymuthica</i> <sup>3</sup>	Peptona 1%, sacarose 5%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2% e NaCl 0,3%	80% de isomaltulose, 7% de trealulose, 1,3% de isomaltulose, 2,9% de glicose, 5,8% de frutose, 0,2% de sacarose e 2,8% de outros utilizando-se células livres e sacarose 40%
<i>Serratia plymuthica</i> <sup>45</sup>	Peptona 1%, sacarose 4,9%, extrato de carne 0,25%, extrato de levedura 0,6%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,14% e NaCl 0,3%	94% de isomaltulose, 2,3% de isomaltulose, 0,8% de glicose e 2,9% de frutose utilizando-se células imobilizadas e sacarose 50%
<i>Serratia plymuthica</i> <sup>31</sup>	Peptona 2%, sacarose 10%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 1%, CaCl <sub>2</sub> 0,6% e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4%	>90% de isomaltulose utilizando-se células livres e sacarose 25%
<i>Serratia plymuthica</i> ATCC15928 <sup>26</sup>	Peptona 1%, sacarose 4% e extrato de carne 0,4%	87% de isomaltulose utilizando-se enzima purificada e sacarose 40%
<i>Serratia plymuthica</i> ATCC15928 <sup>27</sup>	Sacarose 5%, extrato de levedura 0,75%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5%, MgSO <sub>4</sub> 0,04% e (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1%	72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% de glicose e 10,1% de frutose utilizando-se enzima purificada e sacarose 9%

entre os açúcares aumentou em temperaturas mais baixas. A glicosiltransferase apresentou atividade máxima de 13,89 U/mg.

Véronèse e Perlot<sup>49</sup> investigaram o mecanismo de catálise enzimática envolvendo o sítio ativo da glicosiltransferase produzida por *Protaminobacter rubrum*, *Serratia plymuthica* e *Erwinia rhapsodic*. Diferentes monossacarídeos foram utilizados na mistura de reação para verificar o efeito inibidor ou ativador na formação de isomaltulose. Verificou-se que a maioria dos monossacarídeos apresentou efeito inibitório ou nenhum efeito. O modo de ação da glicosiltransferase de *Protaminobacter rubrum* também foi estudado<sup>19</sup>. A enzima catalisou a transglicosilação intramolecular da sacarose formando isomaltulose e também a transglicosilação intermolecular da sacarose, para outros aceptores, formando outros derivados de sacarose.

Celestino<sup>46</sup> estudou a produção, purificação e caracterização bioquímica da glicosiltransferase intracelular de *Erwinia* sp. D12. No estudo da produção da glicosiltransferase, em fermentador de 2 L, verificou-se que a enzima foi produzida na fase exponencial de crescimento, sendo que a produção máxima foi obtida após 3 h de fermentação a 28 °C, e após 4 h de incubação a 30 e 35 °C. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40 °C. A glicosiltransferase purificada mostrou-se termossensível, sendo inativada após 1 h de tratamento a temperaturas superiores a 39 °C e após 3 h, a 35 °C na ausência de substrato. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,7 a 6,3, após 24 h de incubação, a 5 °C. Utilizando-se a glicosiltransferase e solução de sacarose 5 e 10% (p/v) foram obtidos 73,5 e 72,3% de isomaltulose, respectivamente, após 4 h de reação a 40 °C.

A  $\alpha$ -glicosiltransferase purificada de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 converteu sacarose em 72,6% de isomaltulose, 6,6% de trealulose, 10,1% glicose e 10,1% de frutose<sup>27</sup>. A enzima foi obtida pelo rompimento celular em sonificador. O sobrenadante contendo a enzima foi obtido por centrifugação a 20.000 rpm, durante 30 min. A conversão máxima de solução de sacarose 292 mM ocorreu em pH 6,2 e a temperatura de 30 °C. A proporção dos produtos foi dependente da temperatura de reação e o aumento da temperatura aumentou a formação de frutose. Verificou-se que a adição de glicose ou frutose à mistura de reação também alterou a proporção dos produtos, sendo que a glicose atuou como inibidor competitivo. Foi observado também que, a reversibilidade da reação ocorria somente com a isomaltulose e não com a trealulose.

## IMOBILIZAÇÃO

A primeira aplicação industrial utilizando-se um sistema de células imobilizadas foi na produção contínua de ácido L-aspártico<sup>50</sup>. Nos últimos anos houve um grande aumento das pesquisas na área de biocatálise envolvendo a imobilização de enzimas e células inteiras de microrganismos<sup>51,52</sup>. A imobilização de microrganismos pode ser definida como qualquer técnica que limita a livre migração das células<sup>51,53</sup> ou o confinamento físico ou localização de células intactas em uma certa região do espaço com a preservação de desejadas atividades catalíticas<sup>51,54</sup>. As células imobilizadas em uma matriz podem ser protegidas de condições ambientais desfavoráveis como pH, temperatura, solventes orgânicos e substâncias tóxicas, podendo ser manipuladas e recuperadas das soluções<sup>55-57</sup>. Para aplicação na produção de alimentos, a imobilização de células deve ser realizada em uma matriz GRAS (“Generally Recognized As Safe”)<sup>58</sup>. Além de seguro, a matriz de imobilização não pode ser de alto custo, deve ser estável, reutilizável e permitir a imobilização de altas concentrações de células com mínimas limitações de transferência de massa<sup>59</sup>.

As técnicas de imobilização de células microbianas são divididas em quatro grandes categorias baseadas no mecanismo físico empregado: adsorção na superfície de um suporte sólido; aprisionamento no interior de um suporte poroso; agregação natural por floculação ou induzidas com agentes de reticulação ou ligantes; e contenção física dentro de uma barreira<sup>56,57,60</sup>.

### Imobilização por adsorção na superfície de um suporte sólido

A imobilização de células em um suporte sólido ocorre pela adsorção física através de forças eletrostáticas ou pela ligação covalente entre a membrana celular e o suporte<sup>56</sup>. A adsorção pode ser induzida por agentes como óxidos metálicos, glutaraldeído ou aminossilanos. No entanto, para a produção de alimentos e bebidas, a adesão natural é desejável em substituição ao uso de indutores tóxicos ou instáveis. A imobilização natural é considerada uma técnica simples e as condições de realização são suaves; no entanto, como não há barreiras entre as células e a solução, o desligamento e seu religamento são possíveis devido ao estabelecimento de um equilíbrio entre células adsorvidas e livres na suspensão<sup>57</sup>. Existem diferentes tipos de suportes que vêm sendo utilizados atualmente<sup>61</sup>, tais como materiais celulósicos (madeira) e materiais inorgânicos (porcelana porosa e vidro poroso)<sup>56</sup>.

### Agregação celular (floculação)

A floculação tem sido definida como a capacidade de agregação natural das células para formar uma grande unidade<sup>57</sup> ou como uma propriedade das células em suspensão em aderir em grupos e rapidamente sedimentar<sup>56,62</sup>. A habilidade em formar agregados pode ser observada principalmente em fungos, leveduras e células vegetais. Agentes floculantes podem ser utilizados para a indução da agregação das células que não são naturalmente floculantes. A floculação de leveduras tem sido utilizada na elaboração de cerveja, devido a sua simplicidade e baixo custo, e é um fator de grande importância por afetar a produtividade de fermentação e qualidade da bebida<sup>57</sup>.

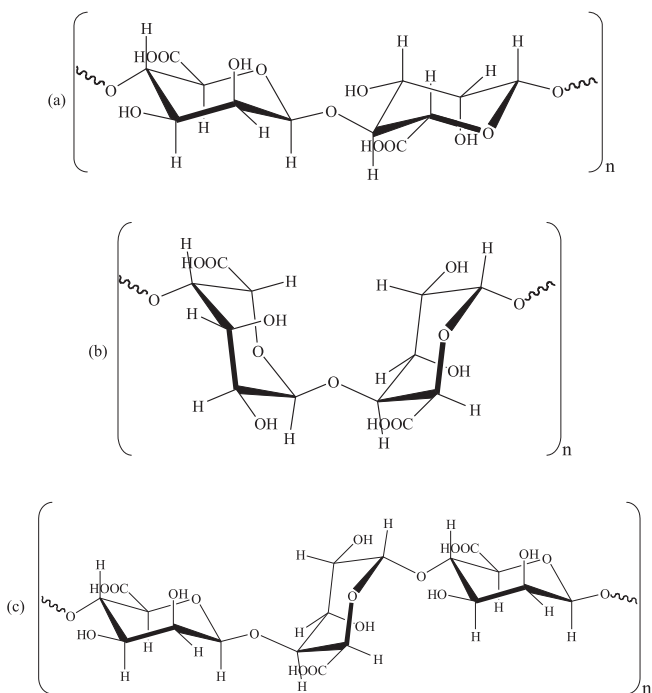
### Contenção física dentro de uma barreira

A contenção dentro de uma matriz pode ser realizada pelo uso de membranas microporosas ou pela contenção das células em microcápsulas<sup>55,60</sup>. Esta técnica de imobilização é utilizada quando se requer produto livre de células, mínima transferência de compostos ou quando produtos de alta massa molecular precisam ser separados a partir do efluente<sup>57</sup>. Problemas inerentes a esta técnica são as limitações pela transferência de massa e a possível saturação da membrana pelo crescimento celular<sup>63</sup>.

### Aprisionamento no interior de um suporte poroso

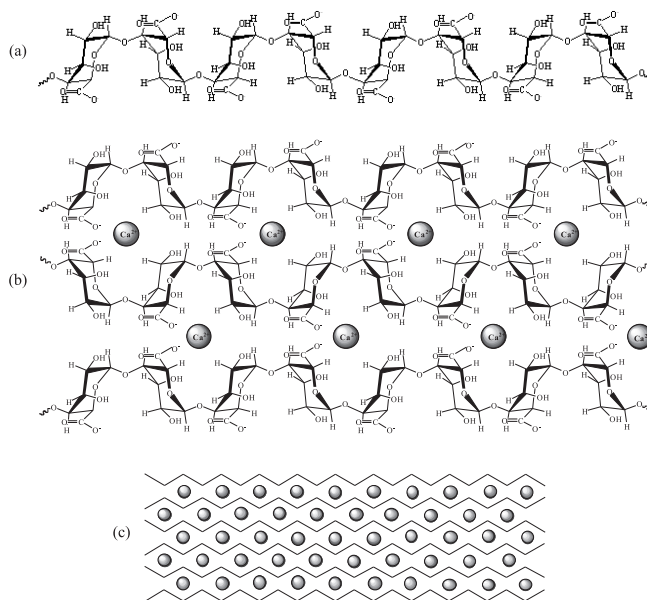
Os métodos de aprisionamento são baseados na inclusão e retenção de células dentro de uma rígida rede ou interstícios das fibras ou poros do suporte para impedir que as células se difundam no meio circunvizinho, enquanto ainda permite a transferência de nutrientes e metabólitos<sup>56</sup>. A técnica de aprisionamento de microrganismos no interior de um suporte poroso é a metodologia de imobilização mais utilizada para a conversão de sacarose em isomaltulose. Grânulos esféricos de polímeros com diâmetros variando de 0,3 a 3,0 mm e imobilização de biomassa são produzidos utilizando-se extrusão ou técnicas de emulsificação, por temperatura ( $\kappa$ -carragena, gelatina, agarose e gelatina) ou por ionização (alginato e quitosana)<sup>52,64</sup>.

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas inteiras por ser uma metodologia simples e barata; além de ser uma técnica reprodutível que utiliza condições suaves durante o processo de imobilização<sup>65-71</sup>. Os alginatos são heteropolímeros lineares de ácidos carboxílicos compostos de subunidades monoméricas de  $\beta$ -D-ácido manurônico (M) e  $\alpha$ -L-ácido gulurônico (G) interligados por ligações 1,4-glicosídicas. Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G ( $G_n$ ), de resíduos M ( $M_n$ ), ou alternando resíduos M e G ( $MG_n$ ) (Figura 2). A quantidade relativa de cada tipo de cadeia varia entre os diferentes alginatos. Existem distintas diferenças estruturais entre os tipos de cadeias<sup>72-74</sup>. Os ( $MG_n$ ) formam as cadeias mais flexíveis e são mais solúveis em valores baixos de pH. Os ( $G_n$ ) formam cadeias rígidas em que duas cadeias G, com mais de seis resíduos cada podem ser ligados por íons bivalentes levando a formação de gel. Em valores de pH baixos, alginatos de alta massa molar protonados podem formar géis ácidos fracos. Nestes géis, à maior parte são cadeias homopoliméricas as quais formam junções, mas a estabilidade depende do conteúdo de cadeias G. Géis com grande quantidade de ( $G_n$ ) exibem alta porosidade, baixo encolhimento durante a formação do gel e menor inchamento após secagem, no entanto, têm maior propensão em apresentar sinérese. Com o aumento da quantidade de ( $M_n$ ), os géis tornam-se mais macios e apresentam poros de menor tamanho.



**Figura 2.** Composição de alginatos: (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados

Na imobilização com alginato uma suspensão de microrganismos é misturada a uma solução de alginato de sódio, suficiente para formar um gel firme. Essa mistura é submetida à extrusão com auxílio de mangueiras e bomba peristáltica, sendo gotejada em solução contendo sais de íons bivalentes como cloreto de cálcio, formando grânulos. Após gelificação, os microrganismos são retidos ou aprisionados dentro do gel. Durante a permanência na solução salina, os íons cálcio são transportados para o centro da esfera e um estado de equilíbrio é atingido variando de 15 min a 12 h<sup>67</sup> (Figura 3). O tempo depende das condições experimentais como temperatura, concentra-



**Figura 3.** Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio

ção do sal, diâmetro da esfera, tipo e concentração de alginato, concentração da suspensão celular. Durante o procedimento de maturação da esfera, em solução de cloreto de cálcio, o aumento do volume pode chegar a 40% em relação ao tamanho original<sup>66,72</sup>.

Alguns aspectos durante a imobilização devem ser observados como a estabilidade mecânica, que pode diminuir com o tempo devido à baixa concentração de alginato ou à grande quantidade de células na suspensão; limitações difusionais dependendo do tipo e concentração do gel. Uma das principais causas do rompimento dos grânulos de alginato é a quelação dos íons cálcio com outros compostos do meio, principalmente por íons fosfato, que pode ser minimizada adicionando-se mais íons Ca<sup>2+</sup> ao meio. A atividade das células imobilizadas depende do tamanho da superfície das esferas, da porosidade do gel formado e das características hidrofílicas do suporte. A polietilenoimina é uma amina polimérica alifática polibásica utilizada nas técnicas de imobilização como um constituinte menor, dando uma característica hidrofílica e maior força mecânica às preparações de células imobilizadas. Pode também ser usada como um constituinte primário do suporte, como agente de reticulação ou ligação<sup>75</sup>. O glutaraldeído é empregado como aditivo no processo de imobilização, como agente de ligação ou reticulação na preparação de esferas de alginato de cálcio<sup>55</sup>.

Shimizu *et al.*<sup>5</sup> estudaram a produção de isomaltulose por células imobilizadas de *Serratia plymuthica* NCIB 8285 em alginato de cálcio utilizando aditivos glutaraldeído e polietilenoimina. A massa celular foi ressuspenso em solução de alginato de sódio 2% (p/v) e gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 N sob agitação, por 2 h. Os grânulos formados foram recuperados por filtração e lavados com água. Todos os experimentos foram realizados em batelada, com sucessiva reutilização dos grânulos e temperatura próxima de 25 °C para evitar a inativação da  $\alpha$ -glicosiltransferase. A maior estabilidade durante a conversão de solução de sacarose 30% (p/p) ocorreu quando os grânulos contendo células imobilizadas foram tratados com solução de polietilenoimina 1,5% (30 g de grânulos para cada 100 mL de solução previamente neutralizada a pH 5,0-5,8 com ácido clorídrico)

e solução de glutaraldeído 1% (30 g de grânulos para cada 100 mL de solução, a 25 °C, por 30 min).

Em estudos comparativos, foi demonstrado que células imobilizadas de *Erwinia rhapontici* NCPPB 1578 em grânulos de gel de alginato de cálcio apresentaram estabilidade 350 vezes maior que as células livres, alcançando-se uma meia vida de aproximadamente 8.600 h<sup>25</sup>. Após fermentação em frascos agitados a 30 °C, as células foram recuperadas por centrifugação. Para a imobilização a suspensão celular 20% (massa celular úmida/v) foi misturada com solução de alginato de sódio 5% (p/v) a pH 6,0 e gotejada em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M pH 6,5, a temperatura ambiente para a formação de grânulos. As células imobilizadas foram dispostas em colunas (200 x 15 cm), mantidas a 30 °C e alimentadas com solução de sacarose 1,6 M ajustada a pH 7,0. As células imobilizadas foram mais eficientes obtendo-se conversão de 90% em isomaltulose. A atividade das células imobilizadas diminuiu com o aumento da concentração das células, o que normalmente ocorre em sistemas difusionalmente limitados e também diminuiu a resistência mecânica.

Células imobilizadas de *Erwinia* sp. foram utilizadas para a conversão de sacarose em isomaltulose<sup>35</sup>. Foram utilizados diversos materiais para imobilização como ágar, k-carragena, goma xantana, poliácridamida, no entanto, o alginato de cálcio apresentou maior eficiência. A massa celular foi ressuspendida em solução de alginato de sódio 5% (p/v) para formar, no final, uma suspensão com 20% de células (p/v). A suspensão foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,1 M a 30 °C, contendo sacarose 15% (p/v) com a finalidade de estabilizar a atividade enzimática das células. As células imobilizadas foram dispostas em colunas (300 x 50 mm) e mantidas a 30 °C. Foi demonstrado que a estabilidade e produtividade aumentaram com o incremento da concentração de sacarose, sendo que foi obtida maior produção de isomaltulose utilizando-se solução de sacarose 55% (p/v) e pH 7. Foram obtidos cerca de 85 a 90% de conversão inicial com meia vida de 8.500 h.

Um novo método foi descrito para a obtenção de isomaltulose utilizando-se células imobilizadas de *Protaminobacter rubrum*, empregando-se 6-cloro-6-dioxi-sacarose em vez de sacarose<sup>7</sup>. As células foram imobilizadas em gel de alginato de cálcio. A atividade máxima das células imobilizadas, em pH 5,5, ocorreu em 3 h e foi proporcional a quantidade de células, sendo obtida conversão de 18, 30 e 44% para 10, 20 e 40 mg de células/mL de solução, respectivamente.

Tsuyuki *et al.*<sup>18</sup> utilizaram a bactéria *Klebsiella planticola* MX 10 para converter sacarose em isomaltulose. A massa celular foi misturada com solução de alginato de sódio 4% (p/v) na proporção 1:1 (v:v) e a suspensão celular foi gotejada em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M sob agitação, formando grânulos com células imobilizadas. Os grânulos foram mantidos na solução por 1 h e, posteriormente, lavados com água destilada e colocados em solução de polietilenoimina 2% pH 5,6. Após 5 min, os grânulos foram separados e misturados com solução de glutaraldeído 0,5% a 5 °C, por 20 min. As células imobilizadas foram separadas da solução de glutaraldeído e lavadas com água destilada. As células imobilizadas tratadas com polietilenoimina e glutaraldeído converteram totalmente a solução 25% de sacarose sendo obtidos 65,4% de isomaltulose e 29,7% de trealulose.

A bactéria *Klebsiella* sp. LX3 produtora de enzima denominada isomaltulose sintase, capaz de converter sacarose em isomaltulose e trealulose, foi imobilizada com solução de alginato de sódio 2% (p/v) em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,65% (p/v), e dispostas em colunas de leito empacotado<sup>42</sup>. Utilizando-se solução 10% de sacarose como substrato, foram obtidos 87% de isomaltulose, 11,6% de trealulose e 1% de glicose.

Ahn *et al.*<sup>36</sup> utilizaram a linhagem *Erwinia rhapontici* ATCC

29283 para converter sacarose em isomaltulose. As células foram recuperadas do meio de fermentação por centrifugação a 1.000 x g a 4 °C por 20 min e lavadas com NaCl 0,9% (p/v). A suspensão celular 40% (p/v) foi misturada com igual volume de solução de alginato de sódio 5% (p/v). A mistura foi gotejada, com auxílio de bomba peristáltica, em solução de cloreto de cálcio 0,15 M para formar as células imobilizadas. Após permanecerem uma noite em solução de cloreto de cálcio a 4 °C, as células foram tratadas com solução de sacarose 55% (p/v) a 30 °C por 2 dias. Os grânulos foram empacotados em colunas (180 x 50 cm e capacidade de 300 mL) a 30 °C e alimentados com solução de sacarose 55% (p/v) pH 7,0. Foram testadas as temperaturas de 27, 30 e 33 °C e os rendimentos iniciais de isomaltulose foram respectivamente, 79, 89 e 85% e diminuíram para 67, 79 e 57% após 60 dias, respectivamente.

Moraes *et al.*<sup>76</sup> verificaram que a produção de isomaltulose a partir de sacarose, utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio em colunas de leito empacotado, foi em torno de 50% de isomaltulose com soluções de sacarose entre 20-30% a 35 °C. Posteriormente, Kawaguti *et al.*<sup>23,24</sup> estudaram a influência da concentração de alginato de sódio, da suspensão de células e aplicação de aditivos glutaraldeído e polietilenoimina na imobilização de *Erwinia* sp. D12 em alginato de cálcio. As células inteiras, recuperadas após fermentação, foram ressuspendidas em água destilada e misturadas a uma solução de alginato de sódio na proporção 1:2. A mistura foi submetida à extrusão com auxílio de uma bomba peristáltica e gotejada em solução de cloreto de cálcio para a formação de esferas contendo as células imobilizadas. Verificou-se que as melhores concentrações de alginato de sódio e suspensão celular foram 2% (p/v) e 40% (massa celular úmida/v), respectivamente. Observou-se que a melhor concentração de aditivo glutaraldeído seria de 0,06% (v/v). Utilizando-se células imobilizadas em colunas de leito empacotado e solução 35% de sacarose foram obtidas taxas de conversão acima de 50% por 282 h.

Outros suportes para imobilização celular também têm sido descritos. Células de *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 foram imobilizadas em DEAE-celulose (dietilaminoetil-celulose) para conversão de sacarose em isomaltulose<sup>20</sup>. Para a produção de massa celular, as células foram ressuspendidas em 10 mL de solução salina e alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em frascos de 1 L, contendo 300 mL de meio ajustado a pH 7,0. Os frascos foram incubados a 230 rpm por 20 h, a 30 °C. Para a imobilização da bactéria na resina trocadora aniônica, 750 mL de suspensão contendo as células foram bombeadas na coluna a uma vazão de 35 mL/h, a 25 °C. Uma solução de sacarose 25% (p/v), pH 7,5 e 30 °C foi bombeada continuamente na parte inferior da coluna. Este sistema permitiu a saída de CO<sub>2</sub>, proveniente da conversão, pela parte superior da coluna. O sistema foi mantido em operação por duas semanas, sendo que a conversão diminuiu com o tempo. O sistema foi renovado pela adição de meio de cultivo esterilizado. Após a conversão foi obtido 79% de isomaltulose, 0,9% de trealulose, 0,9% de frutose, 0,4% de glicose e 18,5% de sacarose.

Krastanov e Yoshida<sup>3</sup> estudaram a conversão de sacarose em isomaltulose por células de *Serratia plymuthica* imobilizadas em quitosana. As células úmidas foram ressuspendidas em solução de NaCl 0,9% (p/v) e misturadas com solução de acetato de quitosana e glutaraldeído. Após a gelatinização, a mistura foi fragmentada em pequenas partículas, lavadas com tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 e mantidas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a 4 °C por uma noite. Utilizando as células imobilizadas em frascos erlenmeyers de 50 mL sob agitação verificaram o efeito da temperatura, do pH e da concentração do substrato na atividade enzimática. Observaram que os parâmetros ótimos foram temperatura 44-45 °C, pH 6,2-6,3 e

concentração de substrato de 40% de sacarose, no qual foram obtidos 80% de isomaltulose e 7% de trealulose. Posteriormente, foi investigada a conversão de sacarose em isomaltulose comparando-se os processos em batelada e contínuo, utilizando células imobilizadas de *Serratia plymuthica* em quitosana<sup>45</sup>. No processo em batelada foi obtida uma produtividade específica entre 0,76 e 1,15/h (kg de sacarose convertida/kg de biocatalisador). No processo contínuo utilizando-se colunas de leito empacotado foi estudado o efeito da concentração do substrato sacarose (30-70%), da temperatura (30-60 °C) e do tempo de residência do substrato na produtividade volumétrica (kg de produto formado/L de biocatalisador/h) específica do biocatalisador. A conversão de 98-100% de solução de sacarose de 30-50% foi obtida após tempo de residência de 1,7-3,0 h. Utilizando-se concentrações maiores de substrato sacarose entre 60-70% foi necessário maior tempo de residência, entre 4-5 h. Utilizando-se concentração de substrato de 40% foi obtido o maior rendimento em isomaltulose de 94%, sendo obtidos menores rendimentos quando foram utilizadas concentrações abaixo de 40%. A estabilidade operacional das colunas de leito empacotado foi de 155 dias, quando se consideraram taxas de conversão acima de 50%. A quantidade de produto acumulado após o processo foi de 1488 kg de isomaltulose produzida por dm<sup>3</sup> de biocatalisador.

## APLICAÇÕES DA ISOMALTULOSE

Os carboidratos da dieta compreendem um complexo grupo de alimentos que possuem diversas propriedades fisiológicas e nutricionais<sup>77</sup>. A sacarose é o principal açúcar consumido no Brasil e tem a desvantagem de ser cariogênico. Bactérias da placa dentária, principalmente *Streptococcus mutans*, estão relacionadas com o desenvolvimento de cáries dentárias como microrganismos patogênicos primários em humanos e animais. *Streptococcus mutans* produz glicosiltransferase extracelular, que catalisa a síntese de glucana extracelular solúvel e insolúvel a partir de sacarose. A síntese de glucana promove a aderência de *Streptococcus mutans* às superfícies sólidas, incluindo aquelas dos dentes. Estes microrganismos são capazes de metabolizar mono e dissacarídeos produzindo ácidos, provocando a queda do pH da saliva e na interface placa-esmalte dos dentes favorecendo a desmineralização do esmalte e, conseqüentemente, desenvolvendo a cárie<sup>14,78</sup>.

O interesse na produção de isômeros da sacarose tem aumentado devido às similaridades sensoriais e ao menor potencial cariogênico. A sacarose possui cinco isômeros: trealulose, turanose, maltulose, leucrose e isomaltulose. A isomaltulose pode ser empregada na maioria dos alimentos industrializados como substituinte da sacarose sem qualquer alteração nos tradicionais processos de manufatura, sendo aplicada na confecção de produtos de panificação, caramelos, frutas enlatadas, gomas de mascar, produtos à base de chocolate, confeitos, pudins, recheios e coberturas, bebidas para esportistas e pasta de dente<sup>79</sup>.

## Cariogenicidade

Estudos com isomaltulose, como substituto da sacarose, incluindo produção de ácidos em placa dentária *in vivo* e *in vitro*, produção de ácido em suspensão de material de placa dentária por *Streptococcus mutans* e efeito da isomaltulose na síntese de glucana têm sido realizados nas últimas décadas<sup>80,81</sup>.

Ooshima *et al.*<sup>14</sup> realizaram estudos relacionados à cárie dentária em ratos utilizando a isomaltulose. A atividade cariogênica foi examinada em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Em meio contendo isomaltulose 1% (p/v), *Streptococcus mutans* pertencentes aos sorotipos a, d e g não fermentaram o carboidrato; no entanto, os

sorotipos b, c, e e f fermentaram. A isomaltulose inibiu significativamente a síntese de glucana insolúvel a partir da sacarose por *Streptococcus mutans*. Em experimentos *in vivo*, ratos foram infectados com *Streptococcus mutans* 6715 e alimentados com uma dieta contendo 56% de isomaltulose e não desenvolveram cáries significativas quando comparados aos grupos controles, os quais foram alimentados com sacarose, glicose, frutose ou glicose e frutose. Os autores comprovaram que a dieta em que se substituiu metade da sacarose por isomaltulose resultou em decréscimo no desenvolvimento de cáries.

Foi descrito o efeito de freqüentes enxágües com solução de isomaltulose e glicose na produção de ácido em placa dentária humana<sup>82</sup>. Após 6 semanas e 6 enxágües diários com solução de isomaltulose 15% (p/v) e glicose 15% (p/v) foi observado que a isomaltulose provocou menor queda de pH (de 7 a 6,2) em relação à glicose, sendo a isomaltulose considerada menos acidogênica. Sasaki *et al.*<sup>83</sup> compararam a cariogenicidade provocada por isomaltulose e sacarose em ratos infectados com *Streptococcus mutans* E-49. Três grupos de ratos Wistar foram alimentados com dietas contendo 56% de isomaltulose, outra contendo 56% de sacarose e uma outra composta de uma mistura de 17,5% sacarose e 38,5% isomaltulose. Os animais foram infectados com *Streptococcus mutans* E-49, sendo que metade dos animais foi mantida com a dieta por 8 semanas, e a outra metade, por 14 semanas. Somente cárie sulcal foi encontrada nos animais alimentados com isomaltulose. O grupo alimentado com sacarose apresentou lesões cáries buco-lingual, sulcal e superficial, enquanto que o grupo alimentado com a mistura de açúcares apresentou menos lesões buco-lingual em relação aos animais alimentados somente com sacarose.

Takazoe *et al.*<sup>6</sup> indicaram a isomaltulose como possível substituto da sacarose em alimentos devido a sua baixa cariogenicidade. Foram realizados estudos incluindo produção de ácido em placa dentária e efeito da isomaltulose na síntese de glucana por *Streptococcus mutans*. Testes em humanos demonstraram que, após enxágüe da boca com soluções de isomaltulose e sacarose 25, 40 e 50% (p/v), houve uma queda menor de pH naquelas pessoas que utilizaram isomaltulose. No estudo da determinação de produção de ácido em suspensões contendo placa dentária foi observado que a produção de ácido foi menor na presença de isomaltulose em relação à sacarose. Foi demonstrado que a produção de ácido foi muito baixa na presença de *Streptococcus mutans* E-49 em relação à sacarose e que nenhuma glucana insolúvel foi sintetizada a partir da isomaltulose pelo mesmo microrganismo.

Hamada<sup>84</sup> citou que cárie dentária é uma doença multifuncional provocada pela interação de três fatores: dentes, bactérias cariogênicas (principalmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e fermentação de açúcares. Inicialmente há a adesão das bactérias na superfície dos dentes, acompanhada pela síntese de glucana insolúvel em água a partir da sacarose por via enzimática pela ação de glicosiltransferases. Foi demonstrado que restrições de sacarose em dietas ou uso de substituintes não fermentáveis da sacarose influenciaram na atividade de glicosiltransferases resultando em diminuição das cáries. Isômeros da sacarose, como isomaltulose e trealulose, não são substratos para glicosiltransferases dos *Streptococcus* e não são utilizados como fonte de energia.

## Propriedades, nutrição e metabolismo da isomaltulose

A isomaltulose possui ponto de fusão de 123-124 °C, menor que a sacarose (190 °C). Possui boa doçura e perfil similar ao da sacarose, não deixando sabor residual. A solubilidade é metade daquela da sacarose, em temperatura ambiente. A viscosidade é ligeiramente

menor. Não é higroscópica como sacarose e lactose. Resiste à hidrólise ácida (ácido cítrico 1,5-15%) e, desta forma, alimentos acidificados ou com vitamina C contendo isomaltulose são mais estáveis que aqueles contendo sacarose. Soluções de isomaltulose 20% a pH 2,0 em ebulição não sofreram hidrólise, após 1 h. A termo-estabilidade é ligeiramente menor que a da sacarose<sup>11,79</sup>. A estabilidade microbiana de produtos preparados com isomaltulose é muito boa. A concentração de insulina e frutose encontrada no plasma humano, após a ingestão da isomaltulose, é aproximadamente metade daquela encontrada após ingestão da sacarose. Em todas as quantidades testadas, as taxas de aumento dos níveis de glicose, insulina e frutose no sangue foram menores para isomaltulose que para sacarose. Como resultado da menor taxa de clivagem e conseqüentemente menor absorção dos monossacarídeos a partir da sacarose, nenhum aumento de desconforto intestinal foi observado. A isomaltulose é completamente absorvida, embora mais lentamente que a sacarose.

Kawai *et al.*<sup>85</sup> investigaram e compararam a concentração de glicose e insulina no plasma em resposta à ingestão de isomaltulose e sacarose. O nível de glicose no plasma aumentou gradualmente e atingiu um máximo de 110,9 mg/dL após 60 min, quando se administraram 50 g de isomaltulose, permanecendo no mesmo nível após 120 min. Ao se administrar em 50 g de sacarose, o mesmo grupo de voluntários apresentou um nível máximo de glicose no plasma de 143,3 mg/dL após 30 min, com acentuada queda posterior. O aumento acumulativo de glicose no plasma devido à isomaltulose foi menor quando comparada à sacarose e as alterações dos níveis da insulina no plasma acompanharam paralelamente os níveis de glicose. Os resultados demonstraram que a isomaltulose é absorvida mais lentamente que a sacarose, sendo indicada como adoçante para pacientes diabéticos. Posteriormente foi demonstrado em experimentos *in vitro*, com mucosa intestinal humana, que o valor da digestão da isomaltulose foi cinco vezes menor quando comparado com a da sacarose<sup>86</sup>. Em estudos *in vivo* foi demonstrado que a administração oral de isomaltulose (1 g/kg) provocou um leve aumento na glicose e insulina do plasma. Os resultados sugeriram que a isomaltulose pode ser utilizada como adoçante calórico por pacientes diabéticos devido ao baixo índice glicêmico<sup>86</sup>.

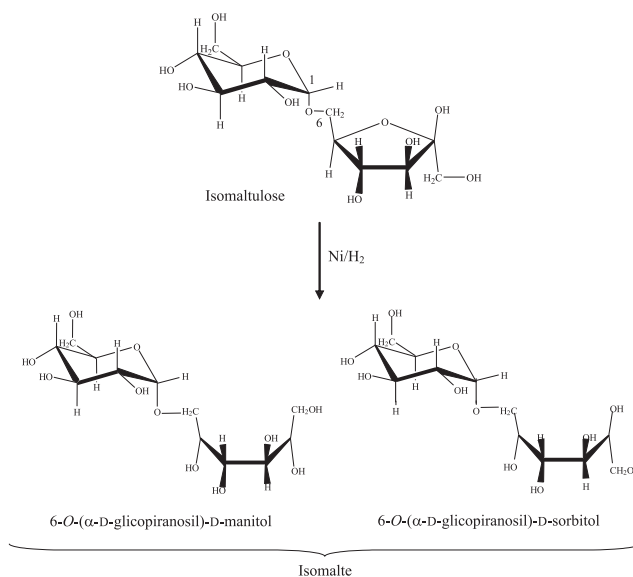
Os efeitos teratogênicos e mutagênicos foram avaliados em fetos de ratos Wistar alimentados com dietas contendo diferentes níveis de isomaltulose (0 a 10%), do primeiro ao vigésimo primeiro dia de gestação<sup>87</sup>. Não foram encontrados indícios tóxicos, nenhum efeito na atuação reprodutiva, em análises dos embriões, fetos, vísceras e esqueletos. A dieta contendo 10% de isomaltulose seria equivalente ao consumo de aproximadamente 7 g/kg de peso corpóreo/dia. O potencial toxicológico da isomaltulose também foi estudado, administrando-se dietas de 0 a 10% por 13 semanas em grupos de ratos Wistar<sup>88</sup>. Observações clínicas diárias evidenciaram que peso corporal, eficiência na conversão dos alimentos e consumo de alimentos e água não foram afetados em nenhuma etapa do estudo. Exames oftalmológico, sanguíneo, de urina, dos tecidos, do sistema nervoso, da atividade motora e imunotoxicidade não revelaram nenhuma anormalidade devido à ingestão de isomaltulose. Foi concluído que a administração de isomaltulose na dieta até 10%, por 13 semanas, pode ser tolerado sem qualquer sinal de toxicidade.

Lina *et al.*<sup>89</sup> relataram que a isomaltulose é um dissacarídeo de ocorrência natural, comercialmente produzida pela conversão enzimática a partir da sacarose e tem sido utilizada como um adoçante no Japão desde 1985. A isomaltulose é utilizada como um substituto não cariogênico da sacarose em produtos para diabéticos e pré-diabéticos. Estudos *in vivo* com ratos e porcos indicaram que a isomaltulose é completamente hidrolisada e absorvida no intestino delgado. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que diversas enzimas intestinais (incluindo humanas) podem hidrolisar isomaltulose. A

taxa de hidrólise, no entanto, é muito baixa quando comparada com a da sacarose e maltose. Logo, os níveis de glicose e insulina no plasma sanguíneo em humanos, após administração oral, aumentou lentamente e atingiu menor valor máximo em relação à administração da sacarose. Após absorção, frutose e glicose foram metabolizados normalmente. A administração de altas doses (de 7 e 8,1 g/kg de massa corpórea/dia em ratos machos e fêmeas, respectivamente) de isomaltulose não resultou em efeitos adversos. Isomaltulose não induziu toxicidade embrionária, efeitos mutagênicos ou efeitos teratogênicos em ratas grávidas e nenhum material tóxico nos fetos foi observado. Em estudos com pessoas saudáveis e diabéticas, altas doses acima de 50 g foram toleradas sem sinais de desconforto intestinal. Com bases nestes resultados conclui-se que o uso de isomaltulose como um adoçante alternativo é tão seguro quanto outros açúcares digeríveis contendo glicose e frutose.

### Produção de isomalte a partir de isomaltulose

O isomalte também conhecido como Isomalt®, Palatinit®, palatinitol ou isomaltitol é uma mistura equimolar de [6-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-sorbitol] e [1-*O*-( $\alpha$ -D-glicopiranosil)-D-manitol] e é produzido por hidrogenação da isomaltulose<sup>79,90-94</sup> (Esquema 2). A doçura relativa do isomalte é cerca de 50% da sacarose e apresenta sabor agradável similar ao da sacarose. Ndindayino *et al.*<sup>95</sup> relataram que há um grande interesse em adoçantes alternativos, como mono e dissacarídeos álcoois, também chamados polióis, em formulações farmacêuticas. A razão deste interesse é a combinação do sabor natural adocicado, conteúdo calórico reduzido e características não cariogênicas. A maioria dos polióis pode ser consumida por diabéticos sem qualquer aumento significativo da glicose, insulina ou concentração de ácido láctico. Dentre os polióis, o isomalte é um açúcar-álcool derivado da sacarose. Na primeira etapa de obtenção, a sacarose é convertida em isomaltulose pela transglicosilação enzimática. Este novo açúcar é considerado mais resistente a ácidos e à ação microbiana, pois a ligação  $\alpha$ -1,6 entre glicose e frutose é mais estável que a ligação  $\alpha$ , $\beta$ -1,2 da sacarose. No segundo passo do processo, o isomalte é obtido pela hidrogenação da isomaltulose em solução aquosa neutra. Além das vantagens técnicas em comparação a outros polióis, o isomalte tem a vantagem de ser similar à sacarose, muito menos higroscópico e com melhores propriedades sensoriais<sup>96</sup>.



Esquema 2. Conversão de isomaltulose em isomalte por hidrogenação



Em 1985, estimou-se que a produção de isomalte seria de aproximadamente 20.000-25.000 t/ano e o preço estimado em US\$ 3/kg. O consumo de isomalte na Europa correspondia a aproximadamente 15.000 t/ano, nos Estados Unidos a 2.000-3.000 t/ano e na América do Sul a 2.000 t/ano<sup>97</sup>. O isomalte pode ser obtido na forma cristalina, não é redutor e, ao contrário da sacarose, é extremamente estável à hidrólise enzimática. Também não pode ser fermentado por grande número de leveduras e microrganismos<sup>96,98</sup>. O isomalte não deixa sabor residual e tem sido utilizado como açúcar dietético em produtos de confeitaria, gomas de mascar, bebidas carbonatadas e sobremesas<sup>81</sup>. O isomalte não é higroscópico e o ponto de fusão é de cerca de 145-150 °C e não sofre reação de Maillard<sup>97-99</sup>. O isomalte pode ser facilmente triturado para serem obtidos grânulos de 100 µm, propriedade que é importante para a fabricação de chocolates e gomas de mascar. O pó finamente granulado pode ser seco para uso como adoçante e pode ser moldado em tabletes<sup>100</sup>. O isomalte reforça a transferência de sabor aos alimentos e um efeito sinérgico ocorre quando é combinado com outros açúcares álcoois como xilitol, sorbitol, manitol (10%). O mesmo sinérgico é obtido quando é combinado com outros adoçantes de doçura intensa como acesulfame-K, aspartame, ciclamato e sacarina. A adição de isomalte tende a mascarar o sabor amargo metálico residual desses adoçantes. O isomalte não tem efeito refrescante como outros açúcares álcoois<sup>88</sup>.

## CONCLUSÕES

A isomaltulose, um isômero da sacarose, é um açúcar redutor composto de uma molécula de glicose e de frutose unidas por uma ligação glicosídica  $\alpha$ -1,6, encontrada naturalmente no mel e no caldo de cana-de-açúcar em pequenas quantidades. A isomaltulose, também conhecida como Palatinose<sup>®</sup>, possui um sabor adocicado suave e propriedades físicas e sensoriais muito similares às da sacarose. Devido ao seu baixo potencial cariogênico é utilizada como ingrediente e substituinte da sacarose em diversos produtos. A partir da isomaltulose podem ser obtidos diversos compostos de interesse industrial, sendo o mais utilizado o isomalte, um açúcar álcool obtido por hidrogenação, que possui baixo valor calórico e baixa cariogenicidade, utilizado em produtos dietéticos e em formulações farmacêuticas. O meio mais utilizado para a conversão de sacarose em isomaltulose é através da glicosiltransferase produzida por algumas linhagens bacterianas. O sistema de células imobilizadas utilizando alginato de cálcio é o método mais utilizado para a produção de isomaltulose, pois permite o seu uso contínuo, previne contaminações de produtos com as células, as mantém igualmente distribuídas no reator, estabilizando assim o processo de biocatálise. Diversos estudos toxicológicos em animais e clínicos em seres humanos têm demonstrado a segurança da utilização da isomaltulose sendo, portanto, um potencial substituinte da sacarose como ingrediente em alimentos e em formulações farmacêuticas.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos em Pesquisa) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. [http://www.conab.gov.br/download/safra/Primeiro\\_Levantamento\\_Cana\\_2006-07\\_maio06.pdf](http://www.conab.gov.br/download/safra/Primeiro_Levantamento_Cana_2006-07_maio06.pdf), acessada em Agosto 2006.
2. Siddiqui, I. R.; Furgala, B.; *J. Apicult. Res.* **1967**, *6*, 139.
3. Krastanov, A.; Yoshida, A.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 593.
4. Nakakuki, T.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1245.
5. Shimizu, J.; Suzuki, K.; Nakajima, Y.; *GB pat.* 2,082,591 **1982**.
6. Takazoe, I.; Frostell, G.; Ohta, K.; Topitsoglou, V.; E Sasaki, N.; *Sweden Dent. J.* **1985a**, *9*, 81.
7. Hashimoto, H.; Yamada, K.; Yoshimura, J.; *Biotechnol. Lett.* **1987**, *12*, 849.
8. Godshall, M. A.; *Food Technol.* **1997**, *51*, 63.
9. Huang, J. H.; Hsu, L. H.; Su, Y. C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *21*, 22.
10. Cheetham, P. S. J.; Imber, C. E. E.; Isherwood, J.; *Nature* **1982**, *299*, 628.
11. Takazoe, I. Em *Progress in Sweeteners*; Grenby, T. H., ed.; Elsevier Applied Science: New York, 1989, cap. 6.
12. Lichtenthaler, F. W.; Peters, S.; *C. R. Chim.* **2004**, *7*, 65.
13. Maki, Y.; Ohta, K.; Takazoe, Y.; Matsukubo, Y.; Takaesu, Y.; Topitsoglou, V.; Frostell, G.; *Caries Res.* **1983**, *17*, 335.
14. Ooshima, T.; Izumitani, A.; Sobue, S.; Okahashi, N.; Hamada, S.; *Infect. Immun.* **1983**, *39*, 43.
15. Irwin, W. E.; *Food Technol.* **1990**, *44*, 128.
16. Lichtenthaler, F. W.; Mondel, S.; *Pure Appl. Chem.* **1997**, *89*, 1853.
17. Kashimura, J.; Kimura, M. E.; Itokawa, Y.; *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1996**, *42*, 69.
18. Tsuyuki, K.; Sugitani, Y.; Miyata, Y.; Ebashi, T.; Nakajima, Y. J.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1992**, *38*, 483.
19. Kakinuma, H.; Yuasa, H.; Hashimoto, H.; *Carbohydr. Res.* **1998**, *312*, 103.
20. Sarkki, M. L.; Heikkilä, H.; Viljava, T.; *US pat.* 5,939,294 **1999**.
21. Lund, B. M.; Wyatt, G. M.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1973**, *78*, 330.
22. Kawaguti, H. Y.; Manrich, E.; Sato, H. H.; *Braz. J. Microbiol.* **2005**, *36*, 227.
23. Kawaguti, H. Y.; Manrich, E.; Sato, H. H.; *Biochem. Eng. J.* **2006a**, *29*, 270.
24. Kawaguti, H. Y.; Buzzato, M. F.; Orsi, D. C.; Suzuki, G. T.; Sato, H. H.; *Process Biochem.* **2006b**, *41*, 2035.
25. Cheetham, P. S. J.; Garrett, C.; Clark, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, *27*, 471.
26. Mcallister, M.; Kelly, C. T.; Doyle, E.; Fogarty, W. M.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 667.
27. Véronèse, T.; Perlot, P.; *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *24*, 263.
28. Park, Y. K.; Uekane, R. T.; Pupin, A. M.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 547.
29. Park, Y. K.; Uekane, R. T.; Sato, H. H.; *Rev. Microbiol.* **1996**, *27*, 131.
30. Moraes, A. L. L.; Steckelberg, C.; Sato, H. H.; Pinheiro, A.; *Ci. Tecnol. Aliment.* **2005**, *25*, 95.
31. Schiweck, H.; Steinle, G.; Muller, L.; Gau, W.; Munir, M.; *US pat.* 4,233,439 **1980**.
32. Heikkilä, H.; Sarkki, M.; Lindroos, M.; Ojala, P.; Ravanko, V.; Tylli, M.; *US pat.* 6,146,856 **2000**.
33. Kawaguti, H. Y.; Sato, H. H.; *Elect. J. Biotech.* **2006**, *9*, 482.
34. Lantero, O. J.; *US pat.* 8,210,940 **1983**.
35. Bucke, C.; Cheetham, P. S. J.; *US pat.* 4,670,387 **1987**.
36. Ahn, S. J.; Yoo, J. H.; Lee, H. C.; Kim, S. Y.; Noh, B. S.; Kim, J. H.; Lee, J. K.; *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1179.
37. Weidenhagen, R.; Lorenz, S.; *Zeitschrift für die Zuckerindustrie* **1957**, *82*, 533.
38. Nagai-Miyata, Y.; Tsuyuki, K.; Sugitani, T.; Ebashi, T.; Nakajima, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2049.
39. Cheetham, P. S. J.; *Biochem. J.* **1984**, *220*, 213.
40. Mundra, P.; Desai, K.; Lele, S.; *Bioresour. Technol.*, **2007**, *98*, 289.
41. Kawaguti, H. Y.; Buzzato, M. F.; Sato, H. H.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *34*, 261.
42. Li, X.; Zhao, C.; Na, Q.; Zhang, D. J.; *Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 521.
43. Wu, L.; Birch, R. G.; *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 93.
44. Miyata, Y.; Sugitani, T.; Tsuyuki, K.; Ebashi, T.; Nakajima, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1680.
45. Krastanov, A.; Blazheva, D.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1306.
46. Celestino, E. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1998.
47. Nagai, Y.; Sugitani, T.; Tsuyuki, K.-I.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1789.
48. Wu, L.; Birch, R. G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1581.
49. Véronèse, T.; Perlot, P.; *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 348.
50. Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; *Appl. Microbiol.* **1974**, *27*, 878.
51. Walsh, P. K.; Malone, D. M.; *Biotechnol. Adv.* **1995**, *13*, 13.
52. Guy-Alain, J.; Jouenne, T.; *Biotechnol. Adv.* **2004**, *22*, 633.
53. Scott, C. D.; *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 66.
54. Karel, S. F.; Libicki, S. B.; Robertson, C. R.; *Chem. Eng. Sci.* **1985**, *40*, 1321.
55. Park, J. K.; Chang, H. N.; *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18*, 303.
56. Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I. M.; Marchant, R.; Koutinas, A. A.; *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 377.
57. Veberlen, P. J.; De Schutter, D. P.; Delvaux, F.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *25*, 1515.
58. Lacroix, C.; Doleyres, Y.; *Int. Dairy J.* **2005**, *15*, 973.
59. Verbelen, P. J.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1515.

60. Jen, A. C.; Wake, M. C.; Mikos, A. G.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 357.
61. Willaert, R. G. Em *Fermentation Microbiology and Biotechnology*; El-Mansi, E. M. T.; Bryce, C. F. A., eds.; Taylor & Francis: London, 2006, cap. 10.
62. Jin, Y. L.; Speers, R. A.; *Food Res. Int.* **1998**, *31*, 421.
63. Lebeau, T.; Jouenne, T.; Junter, G-A.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 434.
64. Chan, L. W.; Lee, H. Y.; Heng, P. W. S.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 259.
65. Vorlop, K. D.; Klein, J. Em *Enzyme Technology*; Lafferty, R. M., ed.; Springer Berlin Heidelberg: New York, 1983, p. 219.
66. Ogonna, J. C.; Amano, Y.; Nakamura, K.; *J. Ferment. Bioeng.* **1989**, *67*, 92.
67. Hulst, A. C.; Tramper, J.; *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 546.
68. Konsoula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 343.
69. Konsoula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 690.
70. Guo, X. L.; Deng, G.; Xu J.; Wang, M. X.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *9*, 1.
71. Idris, A.; Wahidin, S.; *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1117.
72. Klein, J.; Stock, J.; Vorlop, K. D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1983**, *18*, 86.
73. Ertesvag, H.; Valla, S.; *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 85.
74. Chan, L. W.; Lee, H. Y.; Heng, P. W. S.; *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 259.
75. Bahulekar, R.; Ayyangar, N. R.; Ponrathnam, S.; *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 858.
76. Moraes, A. L. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
77. Loo, J. V.; Cummings, J.; Delzenne, N.; Englyst, H.; Franck, A.; Hopkins, M.; Kok, N.; Macfarlane, G.; Newton, D.; Quigley, M.; Roberfroid, M.; Vliet, T. V.; Heuvel, E. V. D.; *Br. J. Nutr.* **1999**, *81*, 121.
78. Moynihan, P. J.; *J. Dent.* **1998**, *26*, 209.
79. Irwin, W. E.; Sträter, P. J. Em *Alternative Sweeteners*; Nabors, L. O.; Gelardi, R. C., eds.; Marcel Dekker: New York, 1991, cap. 16.
80. Takazoe, I.; *Int. Dent. J.* **1985**, *35*, 58.
81. Takazoe, I.; Otha, K.; Shimizu, J.; Suzuki, K.; Iwakura, T.; Nakajima, Y.; *US pat. 4,556,429* **1985b**.
82. Topitsoglou, V.; Sasaki, N.; Frostell, G.; *Caries Res.* **1984**, *18*, 47.
83. Sasaki, N.; Topitsoglou, V.; Takazoe, I.; Frostell, G.; *Sweden Dent. J.* **1985**, *9*, 149.
84. Hamada, S.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 1293.
85. Kawai, K.; Okuda, Y.; Yamashita, K.; *Endocrinology Japonica* **1985**, *32*, 933.
86. Kawai, K.; Yoshikawa, H.; Murayama, Y.; Okuda, Y.; Yamashita, K.; *Horm. Metab. Res.* **1989**, *21*, 338.
87. Lina, B. A. R.; Smits-Van Prooije, A. E. E.; Waalkens-Berendsen, D. H.; *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 309.
88. Jonker, D.; Lina, B. A. R.; Kozianowski, G.; *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1383.
89. Lina, B. A. R.; Jonker, D.; Kozianowski, G.; *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1375.
90. Snodin, D. J.; Daniel, J. W. Em *Developments in Sweeteners 2*; Grenby, T. H.; Parker, K. J.; Lindley, M. G., eds.; Elsevier Applied Science: New York, 1983, cap. 16.
91. Goldscher, R. L.; *US pat. 5,679,781/21* **1997**.
92. Degelmann, H.; Kowalczyk, J.; Kunz, M.; Schuttnhelm, M.; *US pat. 103,894,15* **2000**.
93. Duflo, P.; Fouache, C.; *US pat. 6,204,378*, 20 **2001**.
94. Havenaar, R. Em *Developments in Sweeteners 3*; Greenby, T. H., ed., Elsevier- Applied Science Publishers: London, 1987, cap. 7.
95. Ndinayino, F.; Henrist, D.; Kiekens, F.; Vervaet, C.; Remon, J. P.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *189*, 113.
96. Ziesenitz, S. C. Em *Advances in Sweeteners*; Grenby, T. H., ed.; Blackie Academic & Professional: Glasgow, 1996, cap. 6.
97. Sträter, P. J. Em *Alternative Sweeteners*; Nabors, L. O.; Gekardi, R. C., eds.; Marcel Dekker: New York, 1985, cap. 11.
98. Linke, H. A. B. Em ref. 94, cap. 6.
99. Schiweck, H. M.; Willibald-Ettle, I. Em ref. 96, cap. 4.
100. Grenby, T. H. Em ref. 90, cap. 3.