

Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of the soluble dietary fiber fraction in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root and flour by enzymatic-gravimetric method and high pressure liquid chromatography

RIALA6/1276

Christiane Mileib VASCONCELOS¹, Cassiano Oliveira da SILVA¹, Luciano José Quintão TEIXEIRA², José Benício Paes CHAVES¹, Hércia Stampini Duarte MARTINO^{3*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa/UFV, Av. P. H. Rolfs s/n., Campus da UFV, CEP. 36570-000, Viçosa/MG, tel: +55 31 3899-3741, email: hercia@ufv.br

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Departamento de Engenharia Rural, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil

³Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Recebido: 20.01.2010 – Aceito para publicação: 30.04.2010

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o teor total de fibras alimentares em polpa da raiz (PRY) e de farinha de yacon (FY) pelo método enzimático-gravimétrico segundo AOAC e os frutanos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A FY foi preparada por meio do processo de limpeza, sanitização, branqueamento e a secagem da PRY a 55°C por 48 horas. Foi determinada a composição centesimal da FY e da PRY; o teor de fibras totais correspondeu ao somatório das determinações pelo método enzimático-gravimétrico e HPLC. Encontrou-se elevado teor de fibra alimentar total (matéria seca) nas amostras de PRY e de FY (33,14 e 50,76%, respectivamente), com predomínio de frutooligosacarídeos [FOS] (37,97 e 40,97% respectivamente) e considerável teor de inulina (26,10 e 20,75%, respectivamente). O cromatograma também mostrou elevada concentração de frutose, glicose e sacarose como únicas fontes de carboidratos, além dos frutanos, inulina e FOS. Os métodos enzimático-gravimétricos são considerados os mais apropriados para análises rotineiras de fibras alimentares, contudo estes são ineficazes para determinação de oligossacarídeos com grau de polimerização menor do que 12, como é o yacon. Assim, é necessário efetuar métodos complementares, como HPLC, para quantificar com exatidão o teor total de fibra alimentar dessa raiz.

Palavras-chave. fibras alimentares, raiz de yacon, farinha de yacon, inulina, frutooligosacarídeos.

ABSTRACT

This study aimed at determining the total dietary fiber contents in yacon root pulp (YRP) and yacon flour (YF) by the AOAC enzymatic-gravimetric method, and fructans by high performance liquid chromatography (HPLC). The YF was put through the process of cleaning, sanitizing, bleaching, and YRP was dried at 55 °C for 48 hours. The chemical composition of the YF and YRP was determined, being the total fiber contents the sum of the determinations by enzymatic-gravimetric method and HPLC. High contents of total dietary fiber were detected in the dry mater of both YRP and YF samples (33.14 and 50.76%, respectively), being mostly fructooligosaccharides [FOS] (37.97 and 40.97%, respectively), and substantial inulin contents (26.10 and 20.75%, respectively). The chromatogram also showed high contents of fructose, glucose and sucrose as the sole source of carbohydrates besides fructans, inulin and FOS. The enzymatic-gravimetric methods are considered the most suitable for routine analysis of dietary fibers, but are ineffective for determining oligosaccharides with polymerization degree less than 12, as yacon. Thus, a complementary method, such as HPLC, needs to be carried out to quantify the exacting dietary fiber contents in this root.

Key words. dietary fiber, yacon root, yacon flour, inulin, fructooligosaccharides.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o yacon é comercializado como alimento nutracêutico e tem sido descrito como o alimento com maior conteúdo de frutooligosacarídeos (FOS) na natureza. Uma das principais características destes carboidratos é a estimulação do crescimento de bactérias não-patogênicas por meio da fermentação colônica, levando à modulação da composição do ecossistema natural do intestino grosso, sendo assim classificados como constituintes bioativos com alegação prebiótica¹ e, portanto, funcionais.

Em função dos benefícios nutricionais apontados pelo yacon, a farinha de yacon vem sendo desenvolvida e utilizada como ingrediente em alimentos. Tal fato vem permitindo a formulação de produtos com baixo teor de gordura, reduzido valor calórico e elevada concentração de fibra alimentar, podendo propiciar efeito protetor à saúde do consumidor².

Além das propriedades fisiológicas, as fibras alimentares, especialmente as solúveis ou viscosas³, dentre elas inulina e FOS, que estão presentes no yacon, possuem características que permitem sua aplicação em diversas áreas, pois apresentam elevado poder adoçante e solubilidade, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sensação de secura ou areia na boca, não são degradadas durante a maioria dos processos de aquecimento e não são calóricas⁴.

Contudo, não há ainda um método de análise capaz de quantificar todo o conteúdo de fibras alimentares existente nos alimentos, especialmente se FOS e inulina estiverem presentes nesses alimentos⁵.

O método fibra bruta, um método químico-gravimétrico que estima o valor da fibra baseado na medida do resíduo após digestão *in vitro* com ácido e álcali, foi amplamente utilizado até 1970, sendo considerado obsoleto desde então, porque subestima em 3 a 5 vezes o valor real da fibra alimentar⁶. O método enzimático-gravimétrico, que atualmente é o método mais amplamente utilizado para análises rotineiras de fibras alimentares, como na rotulagem de alimentos, no controle de qualidade e para o objetivo de certas pesquisas, não fornece informações detalhadas de seus componentes⁷, podendo prover informações incompletas sobre a composição dos carboidratos, se outros açúcares como frutose, glicose e sacarose estiverem também presentes⁸. Além disso, quantifica apenas uma pequena fração da inulina e nenhuma de oligofrutanos presente no alimento^{9,10}.

O método desenvolvido por Quemener et al¹¹ que se baseia no tratamento enzimático de produtos com inulinase (Fructozym), seguido por determinação dos açúcares liberados, permite a quantificação apenas dos frutanos presentes no alimento. Os frutanos são removidos com água fervente e, em seguida, tratados com amiloglicosidase e depois com inulinase. A quantidade de glicose, frutose e sacarose é determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Pulso Amperométrico (HPLC-PAD) e a concentração de frutanos é calculada pela diferença entre essas determinações^{12,13}.

Herman et al¹⁴ determinaram fibras alimentares em raízes de yacon, utilizando conjuntamente o método de fibra bruta pelo sistema Fibertec e o método baseado na hidrólise ácida da amostra, seguida por HPLC para determinação dos açúcares livres e quantificação indireta de frutanos, encontrando quantidade média de 0,36 g.100g⁻¹ de fibra bruta e 6,2 g.100g⁻¹ de frutanos em base úmida, totalizando 6,56 g.100g⁻¹ de fibras totais. Diferentemente, o estudo de Silva¹⁵ utilizou apenas o método enzimático-gravimétrico para quantificação de fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis, obtendo valores médios de 0,920; 0,403 e 0,518 g.100g⁻¹ em base úmida, respectivamente, para raízes de yacon de três diferentes localidades do estado de Santa Catarina.

Diante da escassez de métodos capazes de quantificar todo o conteúdo de fibras alimentares existente nos alimentos e a existência de dados contraditórios, o presente trabalho teve como objetivo determinar a composição centesimal da polpa da raiz e da farinha de yacon, avaliando a quantidade total de fibras alimentares pelos métodos enzimático-gravimétrico e HPLC-PAD, propondo uma alternativa para quantificar na totalidade o conteúdo de fibra alimentar desses produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da polpa da raiz de yacon

Foram adquiridos 50 kg da raiz de yacon *in natura*, provenientes do comércio local de Viçosa/MG, sendo retirado aleatoriamente cerca de 1 kg para a realização das análises. O restante da raiz foi utilizado para a elaboração da farinha de yacon, sendo posteriormente retirada uma amostra aleatória para as análises.

A raiz de yacon *in natura* foi inicialmente lavada em água corrente a 25°C, imersa durante 15 minutos em

solução de hipoclorito de sódio 2 mL.L⁻¹ e descascadas manualmente para obtenção da polpa. Em seguida, esta foi embalada em sacos de polietileno e armazenada a 5°C.

Obtenção da farinha de yacon

A produção da farinha de yacon baseou-se na metodologia de Ribeiro¹⁶ com modificações. As raízes *in natura* foram lavadas em água corrente, descascadas manualmente e raladas em multiprocessador (marca WALITA, modelo RI7625). Para sanitizar e evitar a oxidação excessiva, as partes raladas do yacon foram imersas durante 15 minutos, primeiramente, em solução contendo hipoclorito de sódio a 2 mL.L⁻¹ de água e depois, em bissulfito de sódio a 0,1% (m.m⁻¹ da raiz descascada). Após esse procedimento, o líquido foi eliminado com auxílio de uma peneira. Em seguida, as partes raladas de yacon foram depositadas em bandejas de polietileno e secadas em estufa com ventilação forçada (marca Nova Ética, modelo 400/D) a 55°C por 48 horas. Posteriormente, o yacon seco foi triturado em um moinho de rotor (marca MARCONI, modelo MA090CFT) para obtenção de um produto com características de farinha, que foi embalado em sacos plásticos de polietileno, vedados e armazenado sob refrigeração.

Composição centesimal da raiz e da farinha de yacon

As análises de composição centesimal da polpa da raiz e da farinha de yacon foram realizadas de acordo com a AOAC¹⁷: umidade, determinada em estufa a 105°C até peso constante; proteínas, pelo método de Kjeldahl, sendo o teor proteico calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25; lipídios, pelo método de extração com éter etílico em equipamento Soxhlet; e cinzas, por processo gravimétrico, por meio da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550°C até peso constante.

O teor de fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) da polpa da raiz e da farinha de yacon foram determinados de acordo com o método enzimático-gravimétrico da AOAC¹⁷, utilizando o kit enzimático da marca Sigma. Esse método está fundamentado na porção não hidrolisada do alimento que resiste à digestão enzimática sequencial com α -amilase, protease e amiloglicosidase.

O teor de FOS e inulina da polpa da raiz e da farinha de yacon foi determinado por Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (HPLC) com coluna HPX 87P marca BIO-RAD (fase estacionária de chumbo), usando água purificada como fase móvel. As amostras foram diluídas (1 g em 100 mL de água destilada), centrifugadas a 12000 rpm, e depois, filtradas em membrana de decafluoreto de polivinil (PVDF) da Millipore com 0,22 μ m de porosidade e 13 mm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram injetadas em Cromatógrafo líquido marca VÁRIAN, modelo PRÓ-STAR 410 com detector de índice de refração e injetor automático (AUTO SAMPLER 410), com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 85°C, projetando uma sequência de picos que foram comparados com as curvas pré-definidas no equipamento¹⁸.

O teor de fibra alimentar total da polpa de raiz e da farinha de yacon foi obtido por meio do somatório de FAI, FAS, FOS e inulina.

O teor de carboidratos foi determinado por diferença, subtraindo-se de 100 a soma dos valores obtidos de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibras totais conforme AOAC¹⁷.

Os resultados de cada determinação foram expressos como média de três replicatas para cada tipo de amostra, exceto para a análise de fibra alimentar, em que foram realizadas duas replicatas para cada amostra.

O valor calórico da polpa da raiz e da farinha de yacon foi calculado utilizando-se os coeficientes de Atwater que considera 4 kcal.g⁻¹ para proteínas e carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para os lipídios^{19,20}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal e o teor de fibra alimentar da polpa da raiz e da farinha de yacon são apresentados na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição química média e valor calórico da polpa da raiz e da farinha de yacon (g.100g⁻¹), em base úmida e seca

Componentes	Polpa da raiz		Farinha	
	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca
Umidade	91,10	-	6,59	-
Proteína	0,13	1,46	2,61	2,79
Lipídios	0,01	0,11	0,27	0,29
Cinzas	0,30	3,37	3,39	3,63
Fibras totais	2,95	33,15	47,42	50,76
Carboidratos	5,51	61,91	39,72	42,52
Valor calórico (Kcal/g ¹)	22,65		171,74	

Tabela 2. Média dos componentes da fração fibra alimentar encontradas na raiz e farinha de yacon (g.100g⁻¹)

Componentes	Polpa da Raiz	Farinha
Método Enzimático-Gravimétrico		
Fibras insolúveis	0,84	15,91
Fibras solúveis	0,22	2,24
HPLC-PAD		
Oligofrutanos	1,12	19,43
Inulina	0,77	9,84
Total	2,95	47,42

Observou-se elevada concentração de água na polpa da raiz de yacon e, em relação aos demais constituintes, os predominantes foram os carboidratos e as fibras alimentares, que representaram 95% da matéria seca da polpa da raiz (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com os achados na literatura, os quais descrevem que as raízes de yacon apresentam principalmente água e carboidratos, sendo que o percentual de água situa-se entre 85 e 90%, e o percentual de matéria seca entre 10 e 14%, representado principalmente por carboidratos (digeríveis e não digeríveis), que correspondem a aproximadamente 90% da matéria seca^{21,22}.

A obtenção da farinha de yacon, por meio do processo de secagem da polpa, aumentou a concentração dos componentes funcionais, como o FOS e a inulina. Tal fato indica a possibilidade de uso da farinha de yacon como ingrediente em uma ampla variedade de produtos, visto que o FOS e a inulina são estáveis a temperaturas superiores a 140°C²³ e a produção de farinha de yacon diminui a degradação enzimática de FOS em glicose e frutose²².

Tanto a polpa da raiz quanto a farinha de yacon apresentaram elevada concentração de fibra alimentar total (33,14 e 50,76% da matéria seca, respectivamente). Entre os componentes da fibra alimentar (Tabela 2), ocorreu o predomínio de FOS, representando 37,97% do total de fibra alimentar da polpa da raiz e 40,97% da farinha de yacon, em base seca. Além de FOS, é possível observar também elevada concentração de inulina em relação ao total de fibra alimentar, em base seca.

O elevado teor de FOS e inulina nos produtos pode conferir à raiz diversos efeitos benéficos à saúde, especialmente na forma de farinha, podendo sugerir alegação de funcionalidade. De acordo com a ANVISA²⁴,

um alimento tem alegação de funcionalidade quando ele é capaz de fornecer no mínimo 3 g de FOS por porção do produto pronto para consumo. Nesse sentido, a ingestão de 15,44 g.dia⁻¹ de farinha de yacon seria suficiente para fornecer a quantidade recomendada de FOS, bem como o consumo de 267,8 g.dia⁻¹ de polpa da raiz.

Os resultados apresentados no presente estudo, entretanto, não corroboraram os estudos de Marangoni²⁵, que encontrou concentrações de 19,12 e 4,56% de fibra alimentar (base seca), e Ribeiro¹⁶, que obteve valores de 10,50 e 12,83% de fibra alimentar (base seca) para polpa da raiz e farinha de yacon, respectivamente. Tal fato provavelmente ocorreu devido aos métodos analíticos utilizados nestes estudos para determinação de fibra alimentar. No estudo de Marangoni²⁵, foi utilizado o método fibra bruta, e no estudo de Ribeiro¹⁶, o teor de fibra alimentar foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico.

Os métodos enzimático-gravimétricos são capazes de determinar apenas a fração solúvel da fibra com grau de polimerização (GP) maior ou igual a 12, visto que tais fibras são solúveis em etanol a 78% e possuem baixo peso molecular, sendo então perdidas durante a etapa de filtração do precipitado, acarretando, desta forma, uma subestimação no conteúdo de fibras para aqueles alimentos que contêm esses compostos^{6,7}.

Ohyama et al²⁶, ao analisarem a composição de carboidratos de reserva em yacon, verificaram a presença, em maior quantidade, de um trissacarídeo cuja estrutura do oligofrutano foi analisada por ressonância magnética nuclear (¹³C-NMR). Constataram que os tubérculos de yacon acumulam alta concentração de oligossacarídeos de baixo GP, entre 3 e 10 monômeros.

Portanto, não há como determinar os frutanos da polpa da raiz e da farinha de yacon que possuem GP entre 3 e 10, confirmando a necessidade de utilização de métodos que sejam capazes de determinar o teor de oligofrutanos desses alimentos.

O método HPLC tem sido a técnica mais popularmente utilizada para análises de inulina e oligofrutanos. Tanto as fases polares quanto a coluna de HPLC à base de resina são comumente utilizadas com detector de índice de refração para separação de FOS de diferentes GP²⁷.

O cromatograma das amostras de polpa da raiz e da farinha de yacon, discriminando os perfis de açúcares pode ser observado na Figura 1. Visto que as amostras são obtidas a partir do mesmo alimento, o cromatograma de ambos apresenta um perfil idêntico.

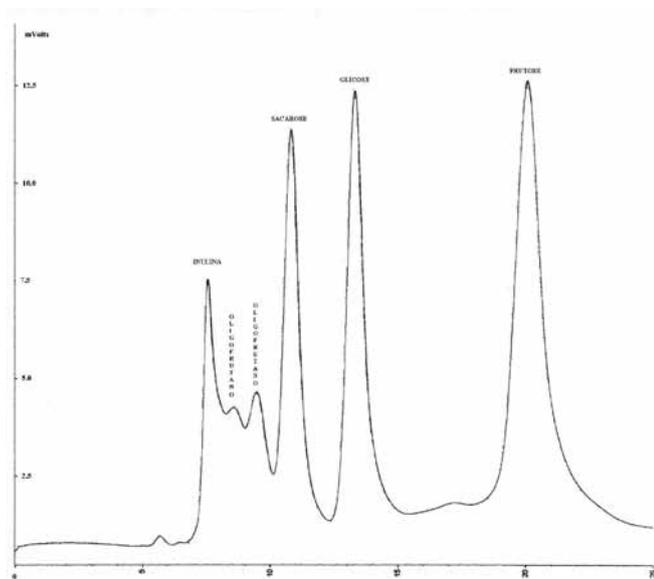


Figura 1. Cromatograma típico da determinação de inulina, oligofrutano, sacarose, glicose e frutose em polpa da raiz de yacon e em farinha de yacon

Observou-se que além de inulina e oligofrutanos, foram encontrados também glicose, frutose e sacarose, o que pode contribuir para a determinação de informações incompletas sobre a composição de fibra alimentar determinados pelo método enzimático-gravimétrico⁷.

CONCLUSÃO

Torna-se necessária a utilização de métodos agrupados para a determinação de fibras alimentares em alimentos ricos em inulina e oligofrutanos como na polpa da raiz e farinha de yacon. Não existem métodos de determinação de fibra alimentar que sejam capazes de quantificar tanto o teor de fibras insolúveis e solúveis em sua totalidade.

Apesar do método enzimático-gravimétrico ser considerado o mais apropriado para análise de fibra alimentar, deve-se atentar para o tipo de alimento, pois este método tende a subestimar a concentração de fibra alimentar solúvel em alimentos ricos em inulina e oligofrutanos, como o yacon e seus produtos. Nestes casos, deve-se associá-lo com outro método que detecta separadamente os monômeros de grau de polimerização (GP) menor que 12.

O presente estudo demonstrou uma eficiente associação da quantificação de fibra alimentar solúvel por meio da utilização do método enzimático-gravimétrico e HPLC, principalmente naqueles alimentos que contêm elevada concentração de inulina e FOS.

REFERÊNCIAS

1. Meier R, Lochs H. Pre and probiotics. *Therapeut. Umschau. Rev Thérapeut.* 2007;64(3):161-9.
2. Rolim PM. Aspectos sensoriais e funcionais de pães com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) [dissertação de mestrado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
3. Anderson JW. Dietary fiber and human healthy. *Hortic Sci.* 1990; 25:1488-95.
4. Bornet FRJ. Undigestible sugars in food products. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:7635-95.
5. McCleary BV. Dietary Fibre Analysis. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2003;62:3-9.
6. Sanchez-Castillo CPS, De Wey PJS, Bourges H, James WPT. Dietary fibre, what it is and how it is measured. *Arch Latinoam Nutr.* 1994;44(2):68-75.
7. Filisetti TMC. Fibra Alimentar - Definições, Componentes e Métodos Analíticos. *In: Silva SMCS, Mura JDP. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 1ª ed. São Paulo: Ed. Roca; 2007. p.179-98.
8. Capito SMP, Filisetti TMCC. Inulina: um ingrediente alimentar promissor. *Cadernos de Nutrição.* 1999; 18:1-11.
9. Coussement P. Inulin and oligofructose as dietary fiber: analytical, nutritional and legal aspects. *In: Cho SS, Prosky L, Dreher M, editores. Complex Carbohydrates in Foods.* New York: Marcel Dekker; 1999. p.203-12.
10. Sangeetha PT, Ramesha MN, Prapullaa SG. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16: 442-57.
11. Quemener B, Thibault JF, Coussement P. Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fiber. *Lebens Wissen Techn.* 1994; 27:125-32.
12. Prosky L, Hoebregs H. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. *J Nutr.* 1999;129:1418S-23S.
13. IFST. Institute of Food Science & Technology. Dietary Fibre [serial on line]. 2007: 1-10. Disponível em: [http://www.ifst.org/document.aspx?id=117].
14. Hermann M, Freire I, Pazos C. Compositional diversity of the yacon storage root. *In: Impact on a changing world. CIP Program Report.* Lima: Centro Internacional de la Papa; 1998: 425-32.
15. Silva ASS. A raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepping & Endlicher) como fonte de fibras alimentares, sua caracterização físico-química, uso na panificação e sua influência na glicemia pós-prandial. [tese de doutorado]. Florianópolis, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
16. Ribeiro JA. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos e lipídios fecais de ratos. [dissertação de mestrado] Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2008.
17. AOAC. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 16th ed. Gaithersburg: 1997.
18. Kaneko T, Kudo T, Horikoshi K. Comparison of CD composition produced by chimeric CGTases. *Agric Biol Chem.* 1990; 54(1):197-01.
19. Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Rodrigues RSM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciênc Tecnol Aliment.* Campinas. 2000;20(2):145-50.

20. Watt B, Mirrill AL. Composition of foods: raw, processed and prepared. Washington: Consumer and Food Economics Research Divisions/Agricultural Research Service, 1963. 198p. (Agriculture Handbooke, 8).
21. Manrique I, Párraga A, Hermann M. Yacon syrup: Principles and processing. Series: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). n. 8B. International Potato Center, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Erbacher Foundation, Swiss Agency for Development and Cooperation. Lima, Peru. 31p.
22. Graefe S, Hermann M, Manrique I, Golombek S, Buerkert A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Res*. 2004; 86:157-65.
23. Moura CP. Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Polymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico. [dissertação de mestrado] Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2004.
24. Brasil. Resolução RDC n° 359, de 23 de dez. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 26 de dez. 2003. Seção 1, p.28-9.
25. Marangoni AL. Potencialidade de aplicação da farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais. [dissertação de mestrado] Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2007.
26. Ohyama T, Ito O, Yasuyoshi S, Iharashi T, Minamizawa K, Kubota M et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Sci Plant Nutr*. 1990; 36(1):167-71.
27. Prapulla SG, Subhaprada V, Karanth NG. Microbial production of oligosaccharides: A Review. In: Laskin AL, Bennet JW, Gadd G. *Adv Appl Microbiol*. New York: Academic Press; 2000. p. 299–37.