

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melaço de cana-de-açúcar

Carlos Eduardo Vieira da Silva

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Carlos Eduardo Vieira da Silva
Engenheiro Químico**

**Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de
melaço de cana-de-açúcar**

**Orientador:
PROF. DR. ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

**Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Ciência. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos**

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Silva, Carlos Eduardo Vieira da
Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de
cana-de-açúcar / Carlos Eduardo Vieira da Silva. - - Piracicaba, 2008.
52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Açúcares 2. Bioquímica celular 3. Bioquímica microbiana 4. Cana-de-açúcar 5.
Compostos orgânicos 6. Leveduras 7. Melão I. Título

CDD 576.11925
S586p

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À minha esposa,

Miriam,

companheira e amiga nos momentos mais difíceis e,

aos meus filhos

Maria Eduarda e Pedro Asafe por estarmos juntos durante este caminho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por completar mais esta etapa da vida.

Aos funcionários do Setor de Açúcar e Alcool (ESALQ/USP): Rosemary, Sylvino, Pedrinho pelo ambiente de trabalho, companheirismo e aprendizado.

Ao Juliano Bragatto e Prof. Carlos Labate do Departamento de Genética – ESALQ/USP, pelas análises de açúcar por cromatografia líquida.

À Profa. Sandra Helena Cruz pela dedicação, orientação, persistência e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde pelo apoio e orientação durante este trabalho.

À Maria da Glória Bibliotecária da Genética.

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Características e Aplicações do FOS.....	14
2.2 Produção de frutooligossacarídeos.....	15
2.3 Leveduras: morfologia e Fisiologia.....	17
2.4 Leveduras dos gêneros Saccharomyces e Kluyveromyces.....	20
2.5 Enzimas produtoras de FOS.....	22
2.6 Melaço de cana-de-açúcar.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Microrganismos.....	26
3.2 Melaço.....	26
3.3 Metodologia.....	26
3.4 Análises Microbiológicas.....	28
3.4.1 Biomassa.....	28
3.4.2 Viabilidade celular.....	29
3.5 Análises Químicas.....	30
3.5.1 Açúcares Redutores Totais.....	30
3.5.2 Separação de açúcares por cromatografia em papel.....	30
3.5.3 Separação de açúcares por cromatografia líquida.....	31

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Estudos de produção de FOS por leveduras cultivadas em meio contendo Sacarose.....	33
4.2 Estudos de produção de FOS por leveduras cultivadas em meio contendo melado de cana-de-açúcar.....	36
4.3 Estudos de produção de FOS em meio combinado.....	39
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	50

RESUMO

PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS) POR LEVEDURAS A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Frutooligossacarídeos (FOS), açúcares não convencionais, são oligossacarídeos de ocorrência natural principalmente em produtos de origem vegetal. Os FOS são produzidos através de uma reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose resultando em 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4). Com o objetivo de produzir frutooligossacarídeos (FOS) a partir do melaço de cana-de-açúcar, linhagens das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluveromyces marxianus* foram cultivadas em meio contendo sacarose ou melaço de cana de açúcar. Após diferentes períodos de cultivo, foram retiradas alíquotas para analisar açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART) pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico); o crescimento celular por turbidimetria a 600nm e a viabilidade celular por coloração com azul de metileno. A produção de frutooligossacarídeos foi acompanhada por cromatografia em papel ou cromatografia líquida. Através da análise qualitativa em cromatografia em papel foi observada a presença de FOS quando o meio contendo melaço foi cultivado por *Kluveromyces marxianus* o mesmo não ocorrendo para o *Saccharomyces cerevisiae*. Em meio contendo sacarose as duas leveduras não apresentaram nenhuma atividade de produção de FOS.

Palavras-chave: Frutooligossacarídeos; Açúcar não convencional; Leveduras; Melaço.

ABSTRACT

Production of fructooligosaccharides from sugarcane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluveromyces marxianus* cells

Fructooligosaccharides (FOS), sugars unconventional, are oligosaccharides of naturally occurring mainly in products of plant origin. The FOS are produced through an enzymatic reaction of transfructosylation of sucrose resulting in 1-kestose (GF2), nistose (GF3) and fructofuranosyl nistose (GF4). Aiming to produce fructooligosaccharides (FOS) from sugar cane molasses, strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluveromyces marxianus* were grown in medium containing sucrose or sugar cane molasses. After different periods of cultivation, aliquots were removed to analyze reducing sugars (AR) and reducing total sugars (ART) by the method of DNS (3,5-dinitrosalicylic acid), the cell growth by turbidimetry to 600nm and cell viability by staining with methylene blue. The production of fructooligosaccharides was accompanied by chromatography on paper and liquid chromatography. Through qualitative analysis on chromatography on paper was observed the presence of FOS when the medium containing molasses cultivated by *Kluveromyces marxianus* otherwise cultivation by *Saccharomyces cerevisiae* did not resulted in the production of the FOS. Both of the yeast did not show any activity for the production of FOS when the medium contained sucrose.

Keywords: Fructooligosaccharides; Not conventional sugar; Yeast; Sugarcane molasses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutanos produzidos durante hidrólise da inulina	16
Figura 2 - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).....	17
Figura 3 - Representação da parede celular de uma célula típica de leveduras.	19
Figura 4 - Microscopia eletrônica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 5 - Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para produção de açúcar e álcool.....	24
Figura 6 - Fluxograma do experimento padrão.....	28
Figura 7 - Câmera de Neubauer.....	29
Figura 8 - Preparo do papel para cromatografia em papel.....	31
Figura 9 - Biomassa e viabilidade celular por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em meio M20, contendo sacarose, a 30°C e 100 rpm.....	34
Figura 10 - Produção de FOS (kestose) e concentração de AR e ART e produção total de FOS por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em meio contendo M20 (sacarose) a 30°C e 100 rpm.....	35
Figura 11 - Biomassa e viabilidade celular por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em meio M50, contendo melação de cana, a 30°C e 100 rpm.....	37
Figura 12 - Produção de FOS (kestose e nistose) e concentração de AR, ART e produção total de FOS por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em meio contendo M50 (melação de cana) a 30°C e 100 rpm.....	38
Figura 13 - Biomassa e viabilidade celular por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em M50, contendo melação e adaptado em sacarose, a 30°C e 100 rpm.....	40
Figura 14 - Produção de FOS (kestose e nistose) e concentração de AR e ART e produção total de FOS por <i>K marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i> após cultivo em meio contendo M50 (melação), pré-adaptadas em sacarose a 30°C e 100 rpm.....	41

- Figura 15 - Análise qualitativa de frutooligosacarídeos por cromatografia em papel, produzidos durante cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio combinado contendo sacarose (M2 e M5) e melaço (M50).....42
- Figura 16 - Análise qualitativa de frutooligosacarídeos por cromatografia em papel, produzidos durante cultivo de células de *Kluyveromyces marxianus* em meio combinado contendo sacarose (M2 e M5) e melaço (M50).....43
- Figura 17 - Produção de FOS total (cestose + nistose) por *K marxianus* e *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio combinado de melaço (M50) e sacarose (M2 e M5) a 30°C e 100rpm.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de cultivo das leveduras para produção de frutooligossacarídeos em sacarose ou melaço.....	27
Tabela 2 - Condições de cultivo das leveduras para produção de frutooligossacarídeos em meio combinado.....	27
Tabela 3 - Resultados obtidos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , meio melaço (M50).....	51
Tabela 4 - Resultados obtidos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , meio sacarose (M20)	51
Tabela 5 - Resultados obtidos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , meio combinado de Sacarose (M2 e M5).com Melaço (M50).....	51
Tabela 6 - Resultados obtidos por <i>Kluveromyces marxianus</i> , meio Melaço (M50).....	52
Tabela 7 - Resultados obtidos por <i>Kluveromyces marxianus</i> , meio Sacarose (M20).....	52
Tabela 8 - Resultados obtidos por <i>Kluveromyces marxianus</i> , meio combinados de Sacarose (M2 e M5) e Melaço (M50).....	52

1 INTRODUÇÃO

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligossacarídeos de ocorrência natural principalmente em produtos de origem vegetal (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOOTS, 1997). São chamados açúcares não convencionais e sua crescente utilização na indústria de alimentos é devido às suas excelentes características funcionais, além de seus aspectos fisiológicos e físicos (SPIEGEL; ROSE; KARABELL, 1994). FOS é o nome comum dado a oligômeros de frutose com unidades frutossil (F) ligadas na posição beta-2,1 da sacarose (GF). Em resposta a uma demanda cada vez mais crescente dos consumidores por alimentos saudáveis e de baixas calorias, o uso de adoçantes alternativos como a palatinose e vários oligossacarídeos como isomaltooligossacarídeos, oligossacarídeos de soja e frutooligossacarídeos apresentam crescimento significativo. Dentre estes, destacam-se os frutooligosacarídeos (FOS) produzidos pela transformação microbiana através de uma reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose (YUN, 1996). A produção em grande escala não é complicada e o gosto é muito similar ao da sacarose. Os FOS são considerados prebióticos, pois promovem, seletivamente, o crescimento de probióticos como *acidophillus* e *bifidus* no trato digestivo. Essa característica faz com que os FOS promovam uma série de benefícios à saúde humana, desde a redução de colesterol até a sua utilização por diabéticos, por ser um açúcar de baixas calorias (BORNET, 1994). O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de açúcar, sendo a região centro-sul o grande pólo produtor com 26,2 milhões de toneladas de açúcar e 20,3 bilhões de litros de etanol, a partir de 431 milhões de toneladas de cana-açúcar. Esta produção é proveniente de 279 indústrias em atividade na região centro-sul, com 87 fábricas autônomas de etanol produzindo somente etanol, 6 com produção de açúcar e 186 usinas produzindo açúcar e etanol (ÚNICA, 2008). O melaço é um subproduto da indústria açucareira contendo acima de 50% de açúcares; apesar de utilizado na produção de etanol ou aminoácidos e outros, continua sendo um resíduo barato e de grande volume gerado durante a produção de açúcar.

Neste contexto este projeto teve por objetivo estudar a utilização de leveduras para produção via enzimática de frutooligossacarídeos a partir de melaço de cana-de-açúcar e estudar condições de cultivo para induzir a produção FOS.

2 DESENVOLVIMENTO

Os frutooligossacarídeos (FOS) estão presentes como compostos de reserva energética em milhares de espécies de vegetais, sendo que muitos são utilizados na alimentação humana; são chamados de açúcares não convencionais e têm tido impacto na indústria alimentícia devido às suas excelentes características funcionais em alimentos, além de seus aspectos fisiológicos e físicos (SPIEGEL; ROSE; KARABELL, 1994). Os FOS são oligossacarídeos não digeríveis pelos sucos digestivos, entretanto podem ser fermentados por bactérias intestinais do cólon (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOUTS, 1997). Possuem efeito na prevenção de cáries dentárias, redução nos níveis séricos de colesterol total e de lipídeos, além de atuarem como estimulantes do crescimento de bifidobactérias no trato digestivo (HIDAKA et al., 1986; MODLER et al., 1990; YOUNES et al., 1995). Eles, também, melhoram o metabolismo das bifidobactérias e diminuem o pH do intestino grosso, destruindo bactérias putrefativas (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOUTS, 1997).

Os frutooligossacarídeos podem ser obtidos por hidrólise enzimática da inulina ou por reação de transfrutossilacção enzimática da sacarose. Aquele ocorre naturalmente em diversas plantas (mais de 36 mil) (ROBERFROID, 1993) e são comercializados como “Raftilose”, produzido pela Orafiti Ltda., da Bélgica, ou como “Frutafit”, produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda. O segundo grupo, obtido pela reação de transfrutossilacção enzimática em sacarose, possui um resíduo de glicose e é comercializado pela Meiji Seika Ltd (Tokyo, Japan) como Neosugar (PASSOS; PARK, 2003).

Os FOS foram introduzidos primeiramente no mercado de alimentos pela Meiji Seika Cia. do Japão em 1984. O Japão tem um dos maiores mercados comerciais. (YUN, 1996). Hoje, os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares, na maioria dos países. São fibras dietéticas, confirmado pelas autoridades legais em vários países e, nos Estados Unidos possuem status GRAS (Generally Recognized as Safe). Comercialmente, os FOS são suplementos caros, a cerca de U\$ 0,20 por grama, o consumo nas doses recomendadas (10g dia⁻¹ por pessoa) pode custar U\$ 2,00 por dia (PASSOS; PARK, 2003).

É visível uma demanda cada vez maior de consumidores por alimentos de baixas calorias. Assim, é também esperado que o consumo de frutooligossacarídeos no mercado de açúcar e de alimentos funcionais continue crescendo. Muitos pedidos para o uso de FOS em alimentos estão atualmente em processo de análise no Japão, Coréia, Europa e Estados Unidos.

Na Holanda consume-se entre 2 a 12g de FOS por dia per capita (HARTEMINK; VANLAERE; ROMBOOTS, 1997). e no Japão o consumo diário está estimado em 13,7 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ (PASSOS; PARK, 2003).

Apesar do acentuado crescimento mundial do mercado de FOS e o baixo custo da sacarose, o Brasil importa todo o FOS que necessita para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Os alimentos como leite em pó (Nestlé) e iogurte (Molico), suplementados com FOS, são encontrados nos mercados brasileiros. Muitos produtos poderiam estar usando estes açúcares e beneficiando a população, mas isso ainda não ocorre, por falta de um processo biotecnológico adequado e otimizado para aplicação industrial.

2.1 Características e Aplicações do FOS

Os FOS apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e não são calóricos, portanto, não podem ser considerados carboidratos ou açúcares, nem fonte de energia, mas podem ser usados de modo seguro por diabéticos. Têm solubilidade maior que a da sacarose, não cristalizam, não precipitam, e nem deixam sensação de secura ou areia na boca. Os FOS podem ser usados em formulações de sorvetes e sobremesas lácteas, em produtos funcionais, em biscoitos e produtos de panificação, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar, produtos para diabéticos, etc., em barras de cereais, sucos e néctares frescos, produtos de confeitaria, molhos, etc. (PASSOS; PARK, 2003).

Além das propriedades promotoras de saúde, estes carboidratos também podem ser usados para melhorar aspectos sensoriais em produtos de panificação de baixo valor calórico (MILNER, 1999). Inulina e oligofrutoses vêm sendo incorporadas em diversos produtos alimentares, principalmente, em produtos de padaria e confeitaria,

como bolo, que têm grande aceitação pelo mercado consumidor devido às suas características reológicas: produtos leves e facilmente mastigáveis; apresentam textura porosa que facilita a digestão e são normalmente muito saborosos (LEITÃO et al., 1984).

Especificamente em formulação de barras de cereais, a utilização dos FOS pode variar de acordo com a sua finalidade. As barras consumidas no desjejum consistem tipicamente de altos níveis de carboidratos, pouca proteína, pouca gordura e pouca fibra. A substituição de parte dos carboidratos (geralmente sacarose, frutose, amido e maltodextrinas) por FOS, pode aumentar a quantidade de fibras desta categoria de barras, melhorando suas características nutricionais. Barras consumidas com diferentes finalidades, como por exemplo, barras energéticas para praticantes de esportes, e aquelas usadas como alimentos funcionais especificamente também são adicionadas de FOS (IZZO; NINESS, 2001).

Estudos (HONDO; OKUMURA; YAMAKI, 2000) indicam a possibilidade de produzir vinagre de yacon contendo frutooligossacarídeos naturais, contidos no próprio yacon. Há também a possibilidade da suplementação de alimentos infantis com frutooligossacarídeos de alto peso molecular e galactooligossacarídeos de baixo peso molecular, no intuito de facilitar o trânsito intestinal de recém nascidos (MORO et al., 2002). Os FOS também podem ser usados em outros tipos de indústrias que não as de alimentos (YUN, 1996).

2.2 Produção de frutooligossacarídeos

Os FOS são obtidos comercialmente por hidrólise enzimática de inulina e consiste de unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose. Os produtos de hidrólise enzimática são uma misturas (2-1) de frutanos do tipo GF_n e F_m, onde *n* varia entre 2 e 60 para inulina de chicória e *m* varia entre 2 e 7 para oligofrutose de chicória (Figura 1) (ROBERFROID; VAN LOO; GIBSON, 1998).

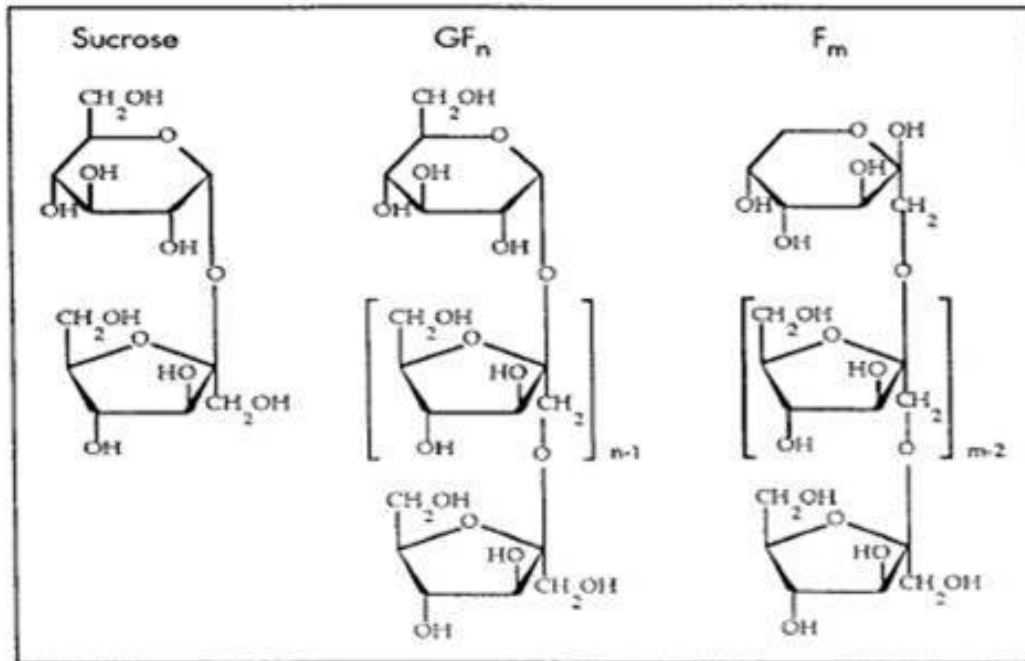


Figura 1 - Frutanos produzidos durante hidrólise da inulina (fonte: ROBERFROID; VAN LOO; GIBSON, 1998)

No segundo grupo estão os açúcares obtidos por reação enzimática de transfrutossilação em resíduos de sacarose e consiste em cadeias lineares de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 2 e 4 unidades de frutossil. Os FOS, deste grupo, são compostos por uma molécula de sacarose no qual é ligado de 1 a 3 moléculas de frutose; os compostos resultantes são: 1-kestose (GF_2), nistose (GF_3) e frutofuranosil nistose (GF_4) (Figura 2), em que as unidades de frutossil (F) são ligadas na posição $(2 \rightarrow 1)$ da sacarose (GF), o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996). Este FOS consiste em unidades de frutossil variando entre 2 e 4 e um grupo glicosil terminal (HARTEMINK; VAN LAERE; ROMBOUTS, 1997).

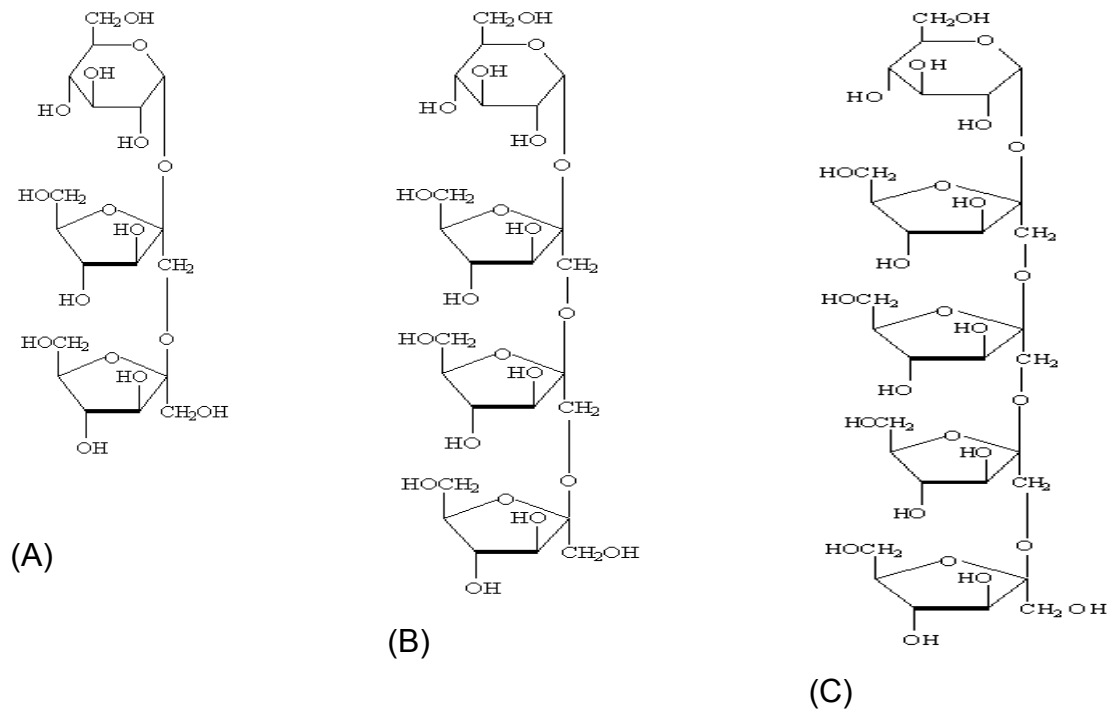


Figura 2 - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C). (Fonte: PASSOS; PARK, 2003)

Os microrganismos utilizados inicialmente para a produção industrial de FOS foram *Aspergillus niger* (Meiji Seika Cia., Japão) e mais recentemente células imobilizadas de *A. pullulans* (Cheil Foods & Chemicals Co., Coréia). Entretanto, as enzimas com potencial para aplicação industrial na produção de FOS podem ser produzidas por fungos como o *Aureobasidium* sp., *Arthrobacter* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., e por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, etc (YUN, 1996).

2.3 Leveduras: morfologia e fisiologia

As leveduras são aplicadas em um grande número de processos fermentativos, onde elas utilizam o açúcar para obter energia para sua manutenção. Do ponto de vista tecnológico, as leveduras possuem vantagens em relação a outros microrganismos, principalmente em razão da sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, de sua alta velocidade de crescimento e da facilidade de separação de sua biomassa (REVILLA; COOPAT, 1999).

As leveduras são microrganismos eucariotas. Constituem um grupo de organismos do tipo fungo, com predominância da forma unicelular e reprodução assexuada vegetativa por gemulação. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores, sendo mais eficientes na realização de alterações físico-químicas no meio em que se encontram, devido a sua melhor relação área/volume. A estrutura celular das leveduras, a maioria, baseadas na espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Suas células são esféricas, elípticas ou cilíndricas, havendo variação em suas dimensões. As leveduras não possuem flagelo ou qualquer outra forma de locomoção. Forma e tamanho das células, mesmo em espécies monomorfas, podem variar de acordo com o nutriente, as condições ambientais, o estado fisiológico ou a idade. As leveduras apresentam um núcleo diferenciado e organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. (AMORIM, 2005).

A morfologia celular, a formação de uma cápsula de polissacarídeos, a ausência ou presença de vacúolos de glóbulos de lipídeos e o desenvolvimento das mitocôndrias dependem das condições físico-químicas e da idade do cultivo do microrganismo. A reserva de aminoácidos livres se localiza nos vacúolos. No conteúdo deles também estão purinas, ortofosfatos polimerizados e hidrolases. A membrana celular é formada por três camadas: uma intermediária constituída por lipídios e fosfolipídios, e outras duas formadas por proteínas. Estas duas últimas intervêm na entrada e saída de solutos e nas reações enzimáticas. Somente a água difunde-se passivamente; para os outros solutos ocorre uma difusão facilitada ou um transporte ativo. A membrana celular é formada por três camadas: uma intermediária constituída por lipídios e fosfolipídios, e outras duas formadas por proteínas. Estas duas últimas intervêm na entrada e saída de solutos e nas reações enzimáticas. Somente a água difunde-se passivamente; para os outros solutos ocorre uma difusão facilitada ou um transporte ativo (BOURGEOIS e LARPENT, 1995 apud ROEPCKE, 2007).

As leveduras, assim como os fungos, absorvem nutrientes que possuem tamanho adequado para atravessar as camadas celulares: parede celular (PC) e membrana celular (MC). A parede celular é de consistência porosa, os quais permitem que as pequenas moléculas iônicas ou neutras sejam absorvidas. A membrana celular consiste a verdadeira barreira à entrada dos substratos, tornando-a seletiva

(GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004). Esta parede não serve apenas para proteção e como estrutura, mas também é metabolicamente importante, estando envolvida com o transporte de nutrientes para o citoplasma (Figura 3).

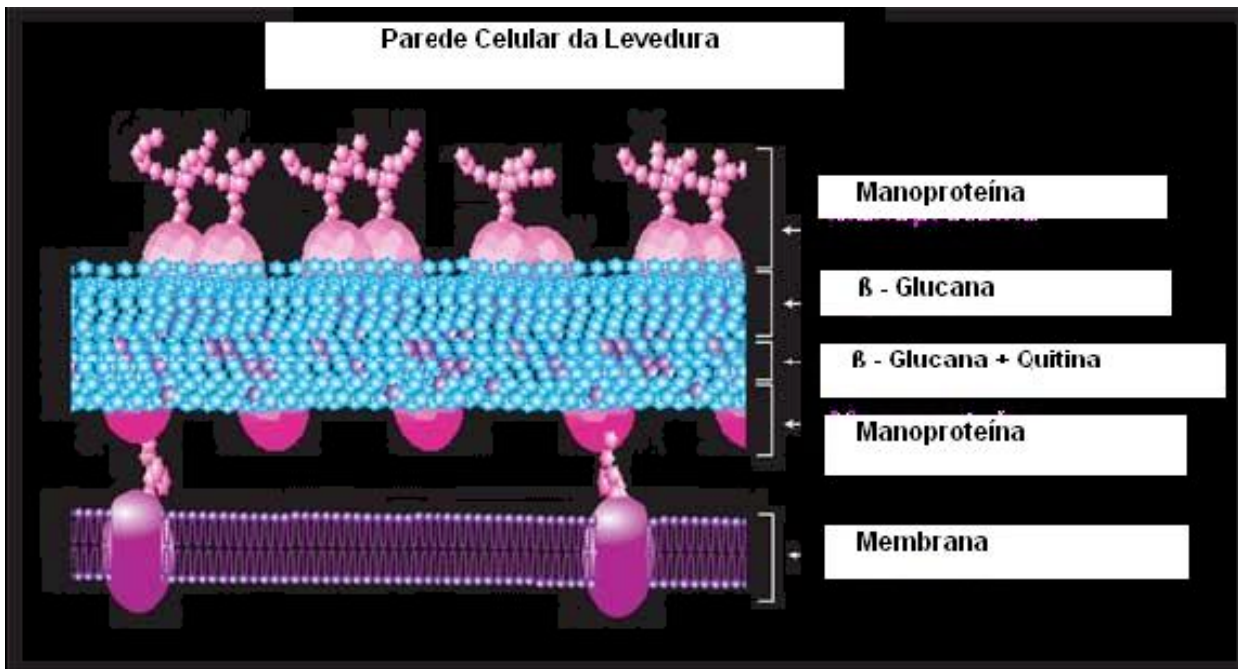


Figura 3 - Representação da parede celular de uma célula típica de leveduras. (Fonte: SIGMA ALDRICH, 2007)

As leveduras por serem microrganismos tão diversificados, ocorrem variedade de reações fisiológicas. a) *Oxigênio*: estas foram os primeiros microrganismos encontrados capazes de crescer na ausência de oxigênio, convertendo açúcar, principalmente em álcool e dióxido de carbono, porém em aerobiose, presença de oxigênio, os produtos formados eram dióxido de carbono e água. A multiplicação de leveduras é mais rápida e produz-se mais células sob condições de aerobiose. b) *Necessidade nutricional*: As leveduras utilizam os mesmos elementos químicos que outras formas de vida: carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, zinco etc. O carbono é obtido dos açúcares, ácidos orgânicos, aldeídos e glicerol. Parte do carbono é utilizada na síntese dos constituintes citoplasmáticos, mas a maior parte é oxidada para produtos de alto conteúdo energético. O nitrogênio é obtido dos produtos de hidrólise de proteínas e de compostos

nitrogenados, tais como: peptonas, aminoácidos, amônia, uréia, etc.. c) *Fatores de crescimento*: as leveduras necessitam de vitaminas. Estes fatores de crescimento são ativos em concentrações muito baixas. Por exemplo, uma levedura que não cresce na ausência de biotina pode crescer quando a concentração da biotina for de 1 ppm. O inositol é menos ativo que a biotina, mas estimula o crescimento quando em concentrações de 10 ppm. A biotina é primordial no metabolismo de nitrogênio e o inositol é aparentemente utilizado na síntese da estrutura celular. d) *pH*: Estes microrganismos crescem melhor em meios ácidos e se desenvolvem bem na faixa de pH entre 4,5 a 5,0. Os limites toleráveis estão situados num pH entre 2,2 a 8,0 de acordo com a espécie. e) *Temperatura*: Crescem numa faixa ampla de temperatura (0 a 47°C). f) *Água*: Em geral as leveduras necessitam de mais água que os bolores e menos água que a maioria das bactérias. Algumas delas podem crescer na presença de altas concentrações de sais ou de açúcares. Microrganismos que resistem à alta pressão osmótica são chamados osmofílicos (COPERSUCAR, 1987).

2.4 Leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*

As linhagens de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* apresentam características antagônicas quanto ao efeito Crabtree, isto é, diferenças metabólicas que definem a via preferencial da utilização do piruvato, com importantes conseqüências sobre o ciclo energético da célula (GONZALÉZ-SISO et al., 2000 apud CRUZ, 2002).

O gênero *Saccharomyces* é largamente utilizado devido a sua fácil manipulação e crescimento; seu metabolismo extensivamente estudado; seu crescimento em altas concentrações de substrato; seu reconhecimento como sendo seguro (fato importante para um produto com grau alimentício de segurança). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são tradicionalmente utilizadas na indústria de panificação, na produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível. É uma levedura que se reproduz através de brotamento (Figura 4).

Diferentes microrganismos podem substituir os suplementos protéicos usados na alimentação humana e animal, com destaque para as leveduras. Consideradas como

fonte de proteína unicelular, interesse na utilização desses microrganismos na alimentação, deve-se a sua velocidade de crescimento e ao seu elevado teor protéico (BUTOLO, 1996).

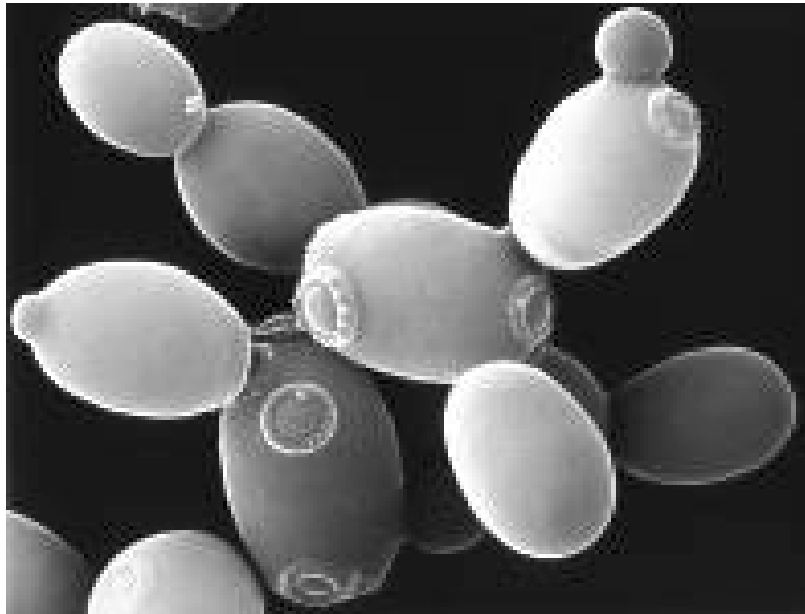


Figura 4 - Microscopia eletrônica de *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: WHEALS, 2007)

A espécie *Kluyveromyces marxianus* apresenta um grande potencial para ser empregada tanto na indústria farmacêutica como na de alimentos. Ela tem sido utilizada na produção em larga escala de proteína unicelular (SCP) a partir de soro de leite. É reconhecida como um microrganismo seguro para o consumo humano (GRAS) pelo FDA. Possui grande capacidade de conversão de substratos em biomassa, e uma baixa taxa de formação de metabólitos, como o etanol (ROEPCKE, 2007).

Diversas pesquisas utilizam linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, em diferentes condições de cultivo para produção de inulinase (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999; CAZETTA et al., 2005) e também de frutooligosacarídeos a partir de sacarose (SANTOS; MAUGERI, 2007).

2.5 Enzimas produtoras de FOS

As enzimas são catalisadores orgânicos, produzidos por células vivas. Quando produzida por uma célula, esta poderá atuar independente da célula, mantendo as condições ideais.

A nomenclatura das enzimas produtoras de FOS apresenta controvérsias; é classificada como uma hidrolase, a α -D-frutofuranosidase (invertase, EC 3.2.1.26) ou como transferase, frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) (YUN, 1996; MAIORANO; SILVA; RODRIGUES, 2008).

A invertase é uma glicoproteína de massa molar 270 kDa, com cerca de 30 cadeias de manana por molécula de proteína, e é encontrada na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sua principal fonte industrial (TOMOTANI, 2002). Diversas são as aplicações da invertase, enzima estudada a décadas, incluindo seu uso como enzima de referência para estudos bioquímicos, como biosensores e/ou produção de açúcar invertido (PARK, 1975). Além da atividade hidrolítica principalmente sobre a sacarose, a invertase possui uma atividade transferásica em concentrações acima de 15% de sacarose, podendo ser ideal para a produção de frutooligossacarídeos (CRUZ et al., 1998).

Entre as enzimas produtoras de xarope de frutose está a inulinase. A produção da frutose obtida pela inulinase microbiana ocorre através de uma única etapa enzimática, produzindo acima de 95% (MARKL et al., 1993). Outra vantagem desta enzima, do ponto de vista industrial, é que uma purificação exaustiva parece ser desnecessária, já que tanto as células lisadas quanto as intactas apresentam atividade elevada. Apesar de serem descritas boas produções de inulinase por fungos e bactérias (VISWANATHAN; KULKARNI, 1995; KANG et al., 1998; PARK et al., 1999), as leveduras são citadas como os microrganismos mais promissores para a produção desta enzima, principalmente as do gênero *Kluyveromyces* (GROOTWASSINK; HEWITT, 1983). Embora os microrganismos sejam excelentes na produção de uma gama de produtos comercialmente valiosos, eles normalmente produzem somente a quantidade necessária para seu metabolismo (DEMAIN, 2000). Assim, torna-se necessário o estudo das condições que afetam o cultivo como pH, temperatura e concentração de substrato para elevar a produção.

2.6 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço é um sub-produto da fabricação do açúcar (Figura 5), apresenta-se como um líquido viscoso, de cor escura e muito doce, do qual não é possível extrair maior quantidade de sacarose cristalizada. Este possui como principais destinos às indústrias de fermentação alcoólica, de panificação e de alimentos para animais. Diante da quantidade abundante gerada nas usinas, o melaço é uma fonte barata e alternativa para a produção de frutooligossacarídeos (FOS), o que justifica o interesse deste trabalho.

A composição do mel de cana é muito variável, pois depende de fatores agrícolas, industriais, como a variedade de cana-de-açúcar, o grau de maturação, clima, condições de cultura, tipo de corte, eficiência industrial entre outros. Aproximadamente 60% dos sólidos solúveis são compostos por sacarose, glicose e frutose. Os principais componentes do melaço são: a água, carboidratos, compostos não-açúcares de origem orgânica como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. O melaço de cana-de-açúcar é constituído por uma fração de origem mineral de grande importância, na qual estão presentes mais de 20 metais e não-metais em diferentes proporções. Entre os cátions encontrados, o potássio, o cálcio e o magnésio ocupam mais que 98% do total. Do nitrogênio presente no melaço somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucleicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melaço é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspártico e glutâmico, que constituem mais de 70% do total (ROMBLA et al., 1999).

Trata-se do produto ideal para a fermentação, uma vez que, além de conter em média 90% de Brix sendo 60% de açúcares redutores, possui outros elementos necessários para que a fermentação ocorra sem a adição de nutrientes.

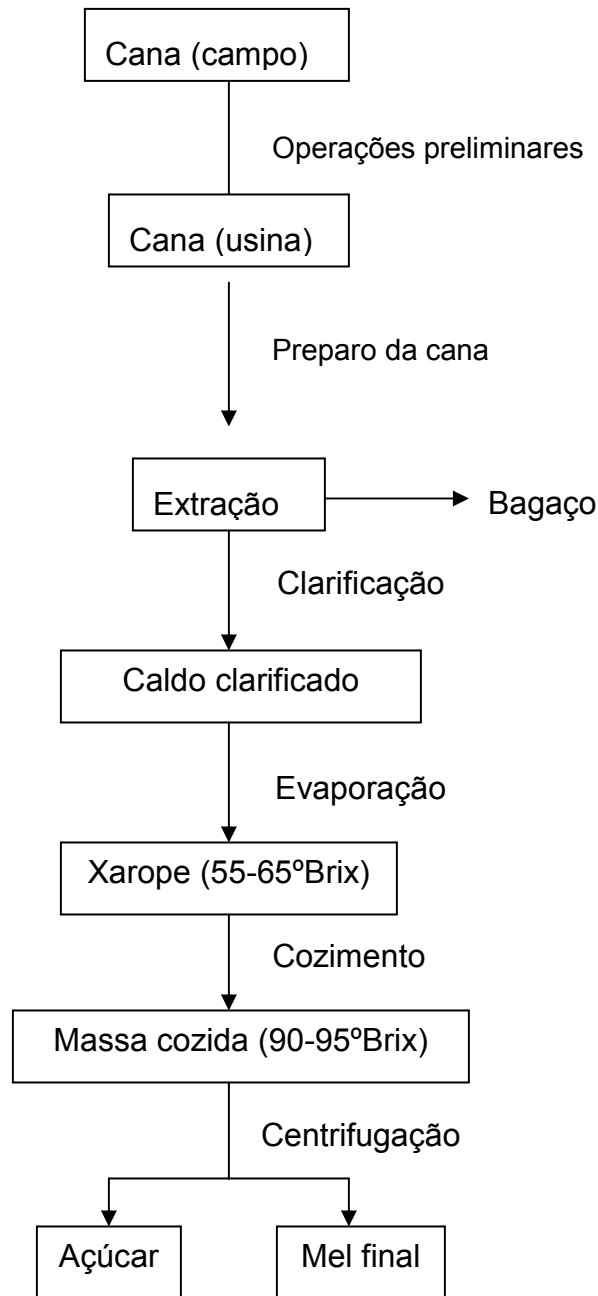


Figura 5 - Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para produção de açúcar e álcool.

Vários fatores que influenciam na composição do melaço ou mel final, destacando-se entre eles a natureza da matéria prima, a qualidade da cana processada, os métodos da fabricação do açúcar, o tempo de armazenamento e as regiões de plantio. Com tantas variáveis agindo individual ou conjuntamente, não há possibilidade de aplicação de números médios para a composição desse substrato. Mesmo considerando-se uma só variedade de cana e um só método de fabricação numa dada região, a composição do melaço varia com a época do ano e com o ano agrícola (COPERSUCAR, 1987). Tosetto (2002) analisou a composição de mel final de 10 unidades produtoras de etanol instaladas em quatro regiões brasileiras. Conduziu fermentações em escala de laboratório com meio de cultivo preparado com esse material. Os dados apresentados mostram variações significativas. A acidez sulfúrica (g/L) variou entre 4,98 e 11,76; o Brix entre 72,0 e 88,2; o ART (g/L) 439,5 e 725,2 e a pureza entre 46,6 e 65,16. O diferente desempenho fermentativo de uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* frente aos diferentes méis também foi constatado nessa pesquisa. O trabalho conclui que não é apenas o nível de esgotamento do mel que determina a qualidade da fermentação, uma vez que méis com maiores purezas nem sempre obtiveram os melhores resultados quanto ao desempenho fermentativo. O trabalho sugere que a infestação de broca na cultura da cana-de-açúcar promove como resposta de defesa da planta, a produção de compostos fenólicos. Esses que são prejudiciais à levedura são carregados para o processo e passam a ser um composto presente no mel e que será enviado para o processo de fermentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ / USP).

3.1 Microrganismos

As linhagens de leveduras utilizadas para biotransformar sacarose em FOS foram *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluveromyces marxianus* pertencentes à Coleção de Cultura do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ / USP). As culturas de leveduras foram mantidas em meio YPD (extrato de levedura 10g/L; peptona 20g/L; glicose 20g/L; agar 20g/L).

3.2 Melaço

O melaço, um sub-produto gerado durante a produção de açúcar, foi proveniente de diferentes usinas de açúcar e álcool da região de Piracicaba.

3.3 Metodologia

Para este trabalho foi utilizado sacarose ou melaço de cana como fonte de carbono ou uma mistura das duas fontes (Tabela 1). A metodologia básica está apresentada a seguir (Figura 6).

Uma alça de levedura crescida em meio YPD foi inoculada em meio M2. Após 24h de crescimento, 1 mL foi transferido para meio M5. Após incubação a 30° C por 48h, dez mililitros de M5, foram transferidos para 50 mL de meio M20 (sacarose) ou M50 (melaço). Os frascos M20 ou M50 foram incubados a 30° C e 100 rpm por 3 dias. Após diferentes tempos foram realizadas amostragens para a análise da concentração de células, viabilidade celular e após centrifugação por 10 minutos a 837 g o sobrenadante foi armazenado para posteriores análises de teores de açúcares redutores e produção de FOS por cromatografia em papel e alguns experimentos foram analisados por cromatografia líquida. Os experimentos foram realizados em duplicata e de forma independente.

Tabela 3 - Condições de cultivo das leveduras para produção de frutooligossacarídeos em sacarose ou melação

	M2	M5	M20	M2	M5	M50
	SACAROSE			MELAÇO		
Fonte de Carbono (p/v)	2%	5%	20%	2%	5%	50%
Extrato levedo (p/v)	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Peptona (p/v)	1%	1%	1%	-	-	-
pH	-	-	6	-	-	6
Condições de cultivo	30 °C / 24h	30 °C / 48 h	100rpm, 30 °C	30 °C / 24h	30 °C / 48 h	100rpm, 30 °C
Volume dos frascos	10 mL	250 mL	250 mL	10 mL	250 mL	250 mL

Nota: - Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Sac – sacarose; Mel – melação.

Tabela 4 - Condições de cultivo das leveduras para produção de frutooligossacarídeos em meio combinado

	Sac 2	Sac 5	Mel 50
Fonte de Carbono (m/v)	2%	5%	50%
Extrato levedo (m/v)	1%	1%	1%
Peptona (m/v)	1%	1%	-
pH	-	-	6,0
Condições de cultivo	30 °C / 24h	30 °C / 48 h	100rpm, 30 °C
Volume dos frascos	10 mL	250 mL	250 mL

Nota: - Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Sac – sacarose; Mel – melação.

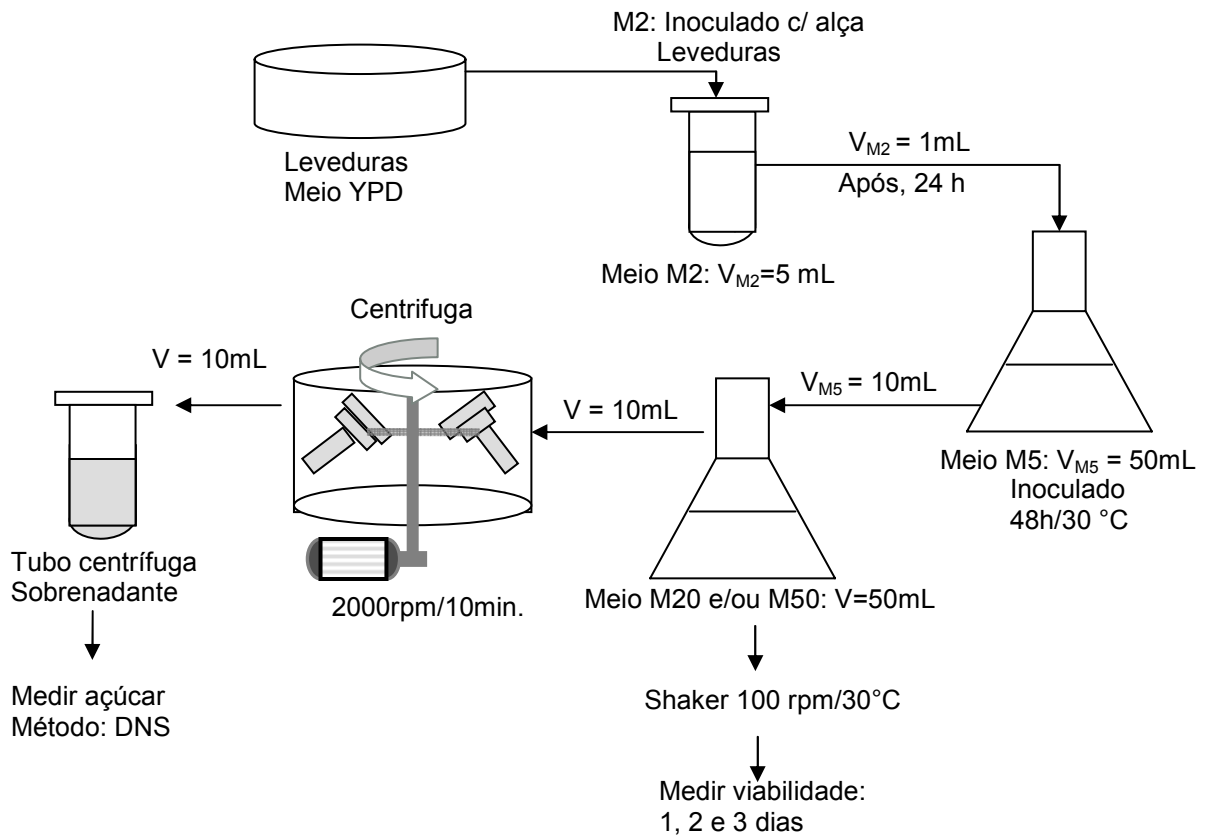


Figura 6 - Fluxograma do experimento padrão

3.4 Análises Microbiológicas

3.4.1 Biomassa

A concentração celular da levedura foi determinada através de medidas turbidimétricas a 600 nm, utilizando água destilada como branco. A turvação está relacionada com a massa de microrganismos presentes. Uma série de diluições de uma suspensão padrão de células de leveduras, de concentração conhecida, possibilitou estabelecer uma curva de calibração, que relaciona os valores de transmitância com a concentração celular (mg/mL) (LIMA, 1975a).

3.4.2 Viabilidade celular

A porcentagem de células vivas foi determinada por meio de exame a fresco da suspensão de leveduras coradas com azul de metileno (LEE et al., 1981; PIERCE, 1970 e ANTONINI, 2004 apud ROEPCKE, 2007). Esta técnica consiste na diluição de 10 μL da amostra com 90 μL de azul de metileno. As células com atividade celular não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) se colorem de azul. A porcentagem de células viáveis será determinada transferindo, com uma pipeta volumétrica, alíquotas de 10 μL da amostra para a câmara de Neubauer (Figura 7). São contadas as células incolores e as coloridas com azul de metileno, em microscópio óptico aumentado de 40X

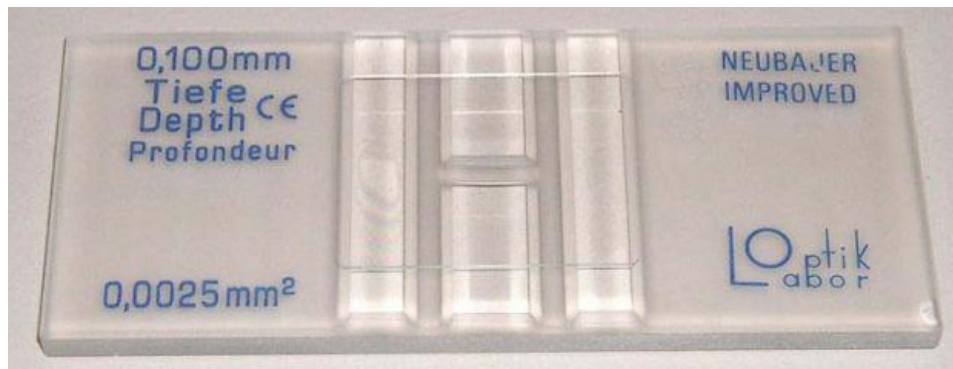


Figura 7 - Câmera de Neubauer (Fonte: WIKIPEDIA, 2007).

3.5 Análises Químicas

3.5.1 Açúcares Redutores Totais

Os teores de açúcares redutores (AR) e (ART), no meio de cultivo, foram determinados pelo método do ácido 3,5 – dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), após hidrólise ácida e diluição conveniente da amostra.

3.5.2 Separação de açúcares por cromatografia em papel

O acompanhamento da produção de frutooligossacarídeos foi previamente analisado por cromatografia em papel, cromatografia descendente, monodimensional e vertical, conforme (Figura 8). A cromatografia em papel é uma técnica simples e econômica de separação de uma mistura, podendo em alguns casos ter uma aplicação qualitativa e quantitativa. Esta baseada nas diferentes solubilidades relativas dos componentes da amostra na fase móvel (líquida) e na fase estacionária (papel de filtro). Os componentes menos solúveis, na fase estacionária, têm uma movimentação mais rápida ao longo do papel, enquanto os mais solúveis são seletivamente retidos, tendo uma movimentação mais lenta.

Alíquotas de 5 L do sobrenadante foram aplicadas em papel de filtro Whatman n. 1. O solvente utilizado como fase móvel foi acetato de etila, iso-propanol e água (6:3:1). Após 15h de eluição, o cromatograma foi revelado com solução contendo difenilamina.

Foram utilizados como padrão, glicose, frutose, sacarose e amostra comercial de FOS (Natural Quality).

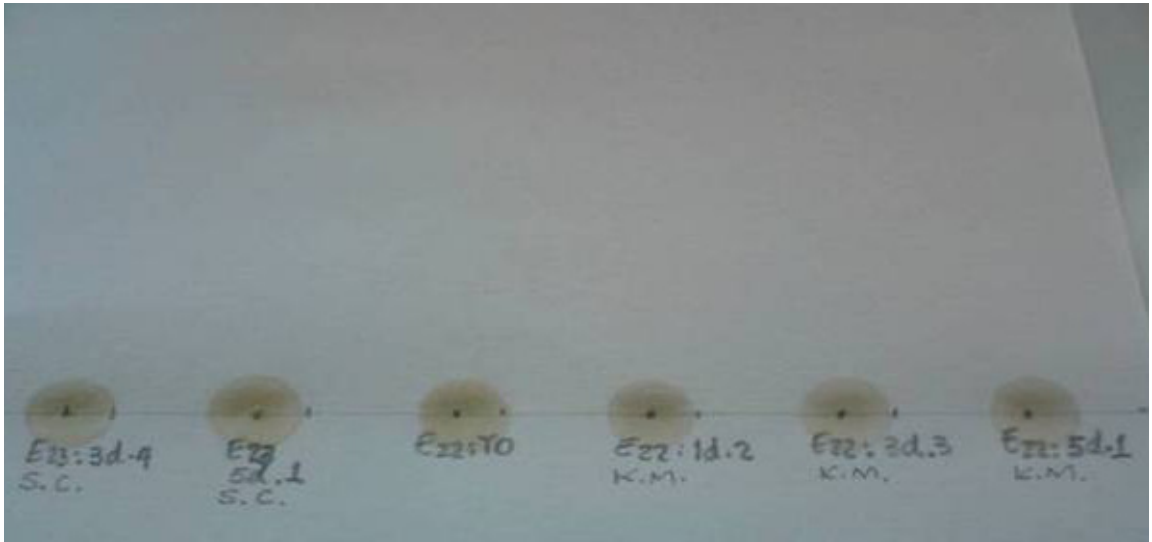


Figura 8 - Preparo do papel para cromatografia em papel

3.5.3 Separação de açúcares por cromatografia líquida

3.5.3.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos monossacarídeos

Alíquotas de 5 L do sobrenadante foram aplicadas em papel de filtro Whatman n. 1. O solvente utilizado como fase móvel foi acetato de etila, iso-propanol e água seguida procedeu-se a quantificação do conteúdo de monossacarídeos via HPAE-PAD, ajustando o equipamento de acordo com Bragatto (2007).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construída de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: D-Glicose, D-Frutose e Sacarose, todos da Sigma[®]. As quantificações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex[®] equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi 5 mM de NaOH e o eluente de limpeza foi de 200mM de NaOH, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, pressão no sistema de aproximadamente 1500 psi. As amostras foram injetadas com volume de 25 µL determinado pelo *loop* de amostragem. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250

mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50mm), e o detector amperométrico associado ao eletrôdo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100mV (0 a 200ms), +100mV de integração (200 a 400ms), -2000mV (410 a 420ms), +600mV (430ms) e -100mV (440 a 500ms).

3.5.3.2 Parâmetros utilizados para quantificação dos Oligossacarídeos

Os eppendorfs contendo as soluções (Melaço, Sacarose e Mix) resultantes do tratamento com microorganismo foram centrifugadas por 10 minutos à 10.000 rpm, em seguida procedeu-se a quantificação do conteúdo de oligossacarídeo via HPAE-PAD, ajustando o equipamento de acordo com Bragatto (2007).

Para a quantificação dos oligossacarídeos, foi construída uma curva de concentração conhecida para cada oligossacarídeo de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: 1-Kestose e Nistose, todos da Sigma[®]. O mesmo equipamento descrito acima foi utilizado para essas determinações. Entretanto, para as separações dos oligossacarídeos o eluente de arraste foi uma mistura de 100mM de NaOH com 150mM de NaOAc, e o eluente de limpeza foi 200mM de NaOH com fluxo de 1 mL.min⁻¹, e uma pressão de aproximadamente 1500 psi. As amostras foram injetadas com volumes de 25 µL determinado pelo *loop* e a coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50mm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutooligosacarídeos (FOS) são produzidos através de uma reação enzimática de transfrutossilacção em resíduos de sacarose resultando em 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4). Com o objetivo de produzir FOS a partir do melaço de cana-de-açúcar, linhagens das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluveromyces marxianus* foram cultivadas em meio contendo sacarose ou melaço de cana de açúcar. O estudo da produção de frutooligosacarídeos por leveduras em meio combinado de melaço e sacarose também foi realizado. A seguir estão detalhados os resultados obtidos em cada etapa.

4.1 Estudos de produção de FOS por leveduras cultivadas em meio contendo sacarose

As linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluveromyces marxianus* foram analisadas em meios contendo sacarose visando a produção de FOS. Nesta condição, *K. marxianus* apresentou uma produção de biomassa aproximadamente 20% superior a produção obtida por *S. cerevisiae* após 3 dias de cultivo. Coincidentemente, a viabilidade celular apresentou uma queda mais acentuada para a levedura *S. cerevisiae*, atingindo apenas 20% após três dias de cultivo (Figura 9).

Na Figura 10A, observa-se que as duas leveduras estudadas produziram uma pequena quantidade de FOS, neste caso a kestose (GF2). Os valores obtidos após um dia de cultivo de *K. marxianus* foram mais elevados que para a *S. cerevisiae*. As Figuras 10B e 10C sugerem que ocorreu menor quantidade de Açúcares Redutores (AR) pela *K. marxianus* que a outra levedura e uma maior quantidade de Açúcares Redutores Totais (ART) presente no meio. A levedura *S. cerevisiae* produziu maior quantidade de (AR) que a outra levedura e, também, uma menor quantidade de (ART). A produção de FOS, na forma de kestose foi baixa, apesar disto após o primeiro dia observou-se uma produção de FOS de aproximadamente 72% maior para *K. marxianus*, 1,21 mg/mL e, *S. cerevisiae*, 0,7 mg/mL.

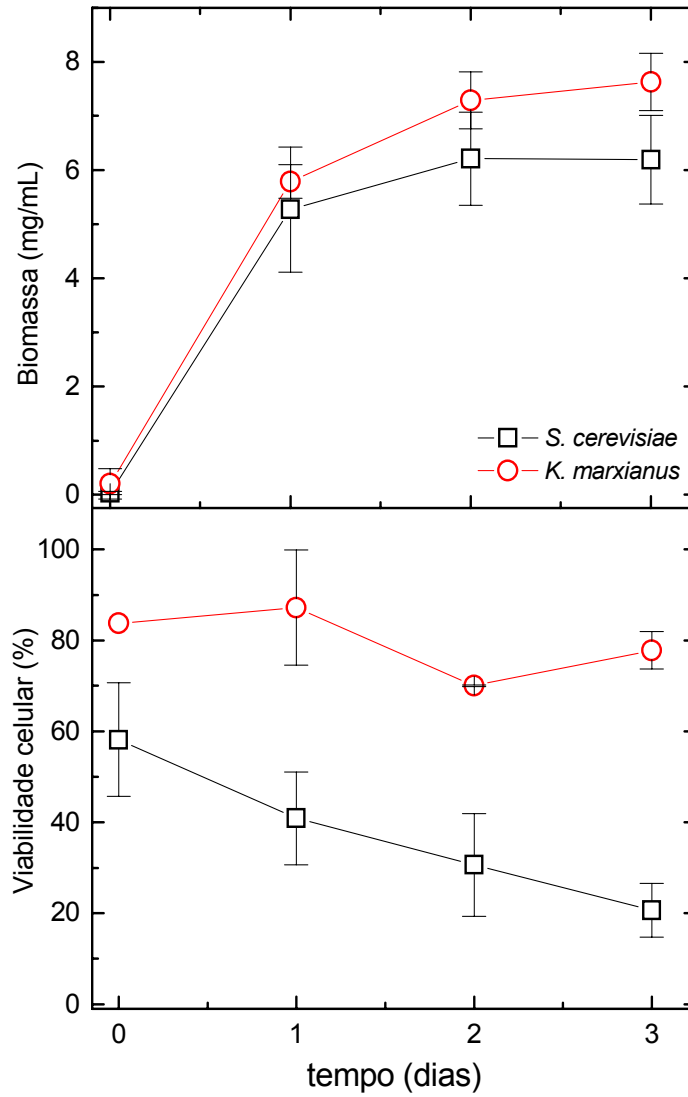


Figura 9 - Biomassa e viabilidade celular por *K marxianus* e *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio M20, contendo sacarose, a 30°C e 100 rpm

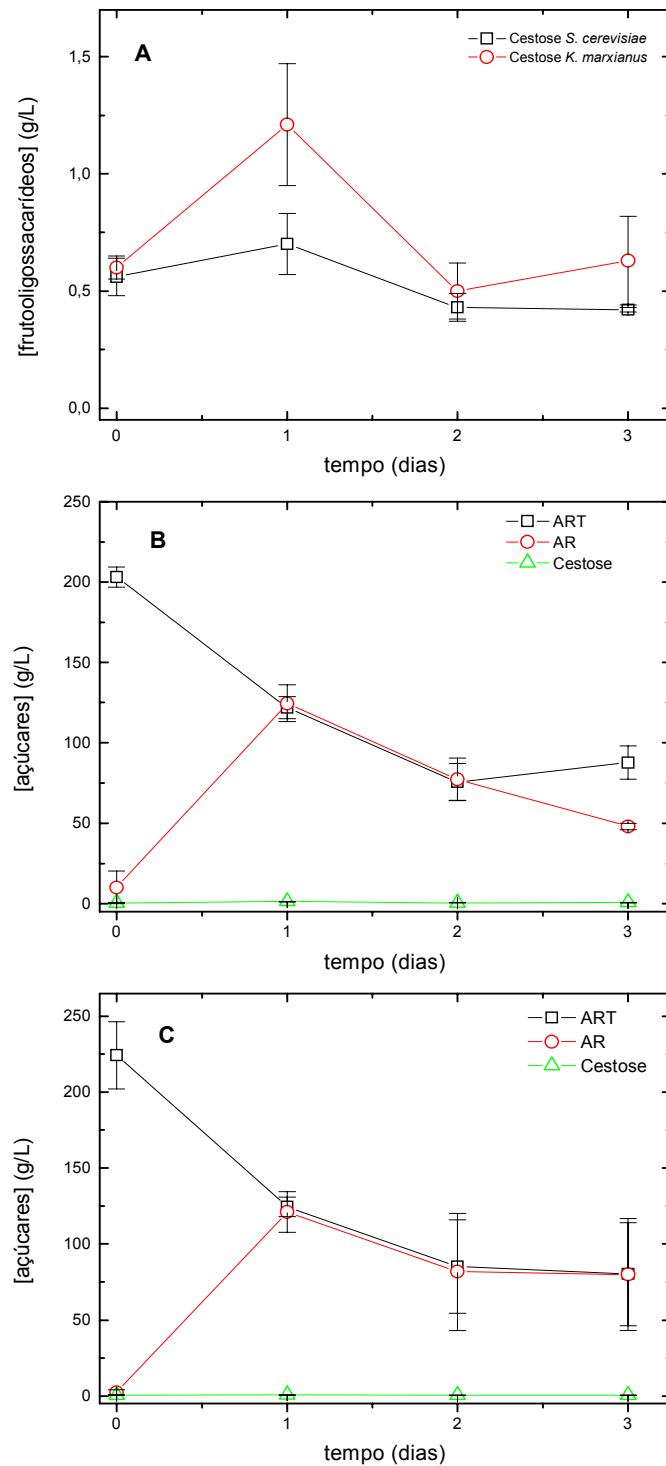


Figura 20 - (A) Produção de FOS (cestose) e concentração de AR e ART e produção total de FOS por (B) *K marxianus* e (C) *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio contendo M20 (sacarose) a 30°C e 100 rpm

4.2 Estudos de produção de FOS por leveduras cultivadas em meio contendo melaço de cana-de-açúcar

O melaço ou mel final, obtido após separação dos cristais de açúcar, é um subproduto da indústria açucareira e rica em açúcares. Portanto, este composto foi utilizado visando à produção de FOS após cultivo com as linhagens de leveduras. Nesta condição, as linhagens de *K. marxianus* e *S. cerevisiae* apresentou uma produção de biomassa em torno de 9 mg/mL e a *S. cerevesiae*, valores de próximos a 3 mg/mL. com manutenção da viabilidade celular após 3 dias de cultivo de 67% (Figura 11). A produção de FOS, na forma de nistose e cestose foi irrelevante (Figura 12A). Porém, observa-se que para o *Kluyverimyces marxianus* e *S. cerevesiae* há um consumo de cestose, no tempo zero, têm-se valores próximos de 1,3 mg/mL FOS (cestose) que até o primeiro dia de cultivo quase zera este frutooligossacarídeo e, do segundo ao terceiro dia, há a manutenção de cestose em torno de 0,6 mg/mL, ver figura 12A. A produção de nistose é irrelevante, porém observa-se uma tendência de produção que parte do tempo zero com valores próximos de 0,1 mg/mL, para as duas linhagens, até 0,17mg/mL para *K. marxianus* e, 0,12 mg/mL para *S. cerevesiae* no terceiro dia de cultivo, conforme Figura 12A.

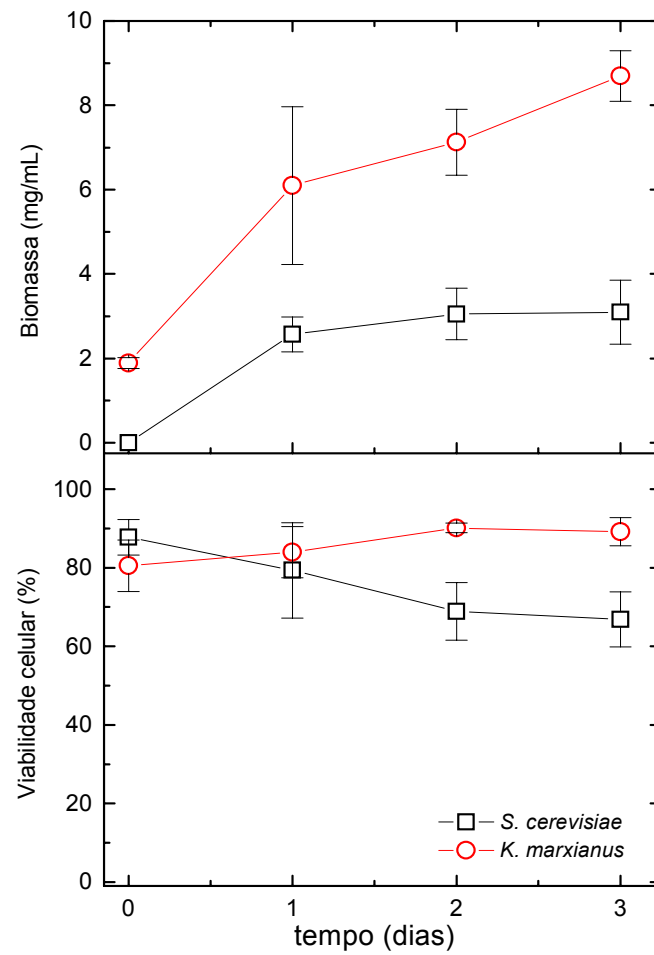


Figura 31 - Biomassa e viabilidade celular por *K marxianus* e *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio M50, contendo melão de cana, a 30°C e 100 rpm

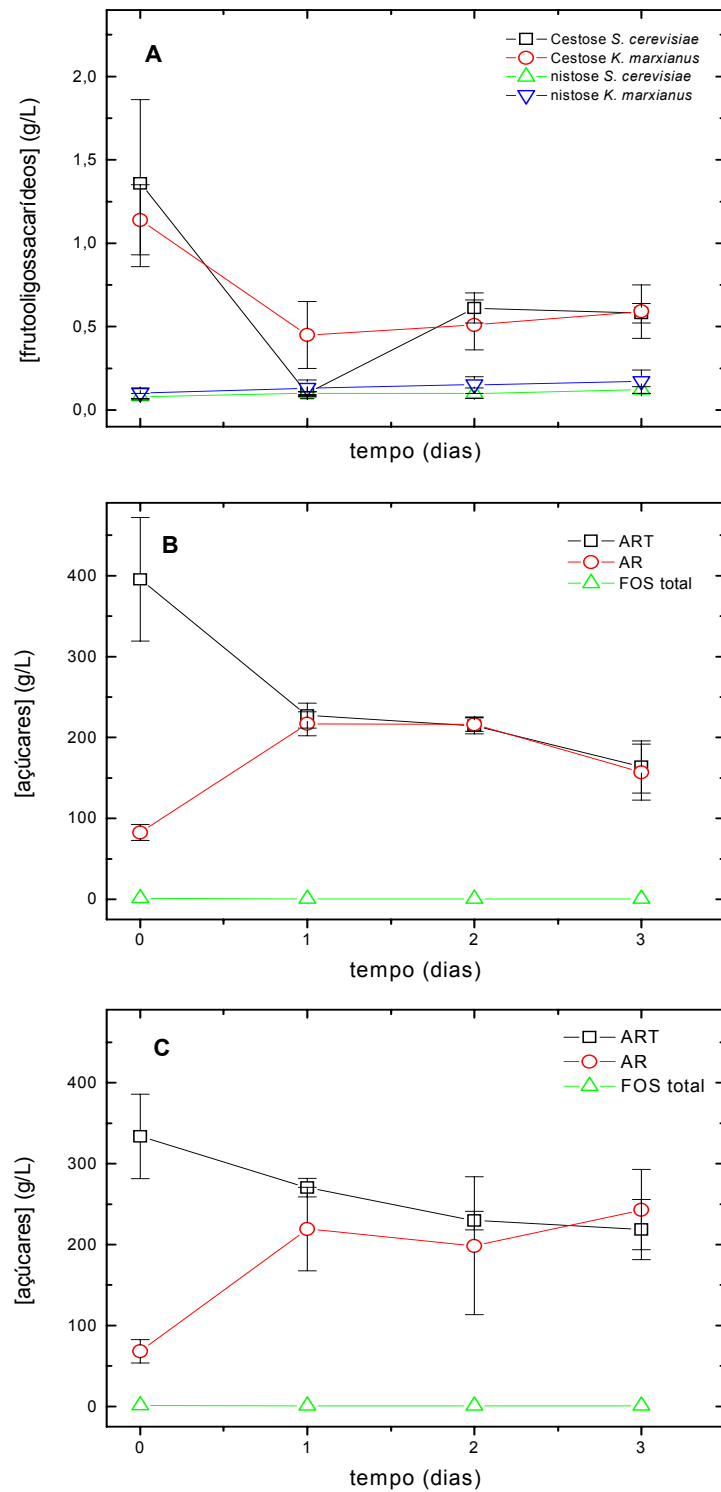


Figura 42 - (A) Produção de FOS (cestose e nistose) e concentração de AR, ART e produção total de FOS por (B) *K. marxianus* e (C) *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio contendo M50 (melado de cana) a 30°C e 100 rpm

4.3 Estudos de produção de FOS em meio combinado

A produção de FOS por leveduras em meio contendo sacarose ou melaço de cana apresentaram valores insignificantes. Devido a isto, foi realizada uma adaptação das leveduras, com cultivo das mesmas em meio M2 e M5 contendo sacarose e a produção de FOS em meio M50 contendo melaço. Nesta condição, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou uma produção de biomassa de 14,12 mg/mL e, a *Kluveromyces marxianus* atingindo valores próximos a 19,32 mg/mL, após o quinto dia de cultivo. No entanto, a viabilidade celular apresentou uma queda mais acentuada para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, atingindo 14,50%, contra 77,36% para a outra levedura, após o quinto dia de cultivo (Figura 13).

O meio que apresentou maior quantidade de frutooligossacarídeo (FOS) foi o meio combinado, pois este meio é composto por sacarose e melaço, onde este último possui açúcares e minerais que apresentam uma maior oferta para o metabolismo celular. O microrganismo que apresentou maior quantidade de FOS (cestose e nistose), no terceiro dia, foi o *Kluveromyces marxianus* no total de 2,38 mg/mL, já para o *Saccharomyces cerevisiae* apresentou 0,73 mg/mL de FOS (cestose e nistose). No tempo zero, têm-se valores em torno de 4,0 mg/mL e, ao longo do primeiro ao quinto dia de cultivo, há um consumo de cestose para os dois microrganismos. A nistose, não é observado tendência de produção ou consumo, para as duas linhagens de leveduras, conforme Figura 14A.

Nestas condições, o *Kluveromyces marxianus* obteve uma melhor resposta para produção de biomassa no terceiro dia, com valores em torno de 7,01 mg/mL, contra 4,92 mg/mL para *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, a viabilidade do primeiro foi em torno de 76,65 %, contra 58,31 % de *S. cerevisiae* no terceiro dia de cultivo, ver Figura 13.

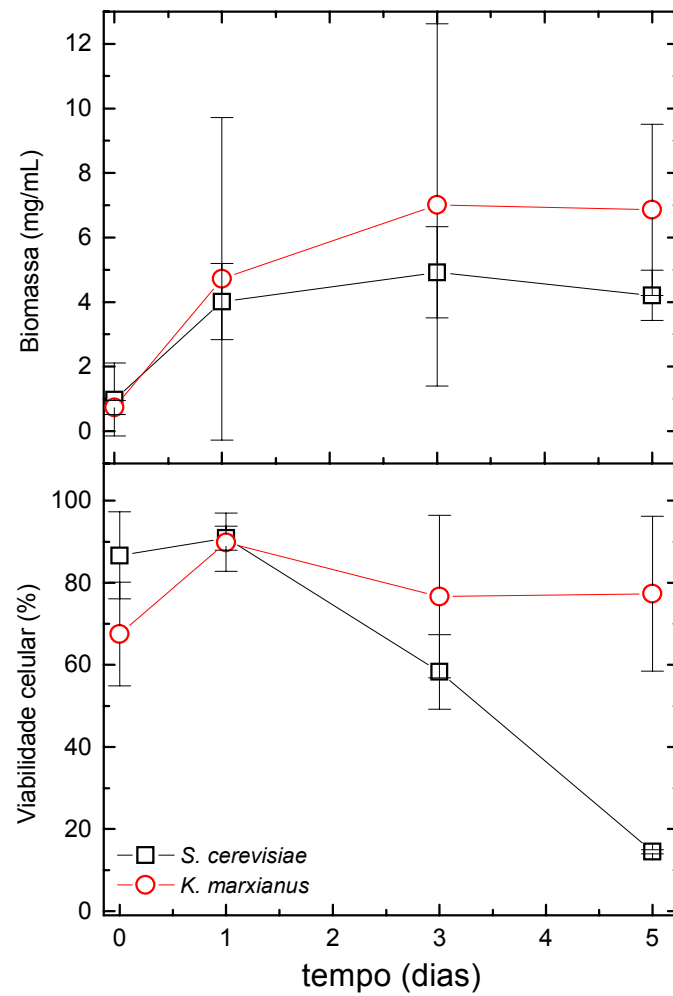


Figura 53 - Biomassa e viabilidade celular por *K marxianus* e *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio combinado de melão (M50) e sacarose (M2 e M5), a 30°C e 100 rpm

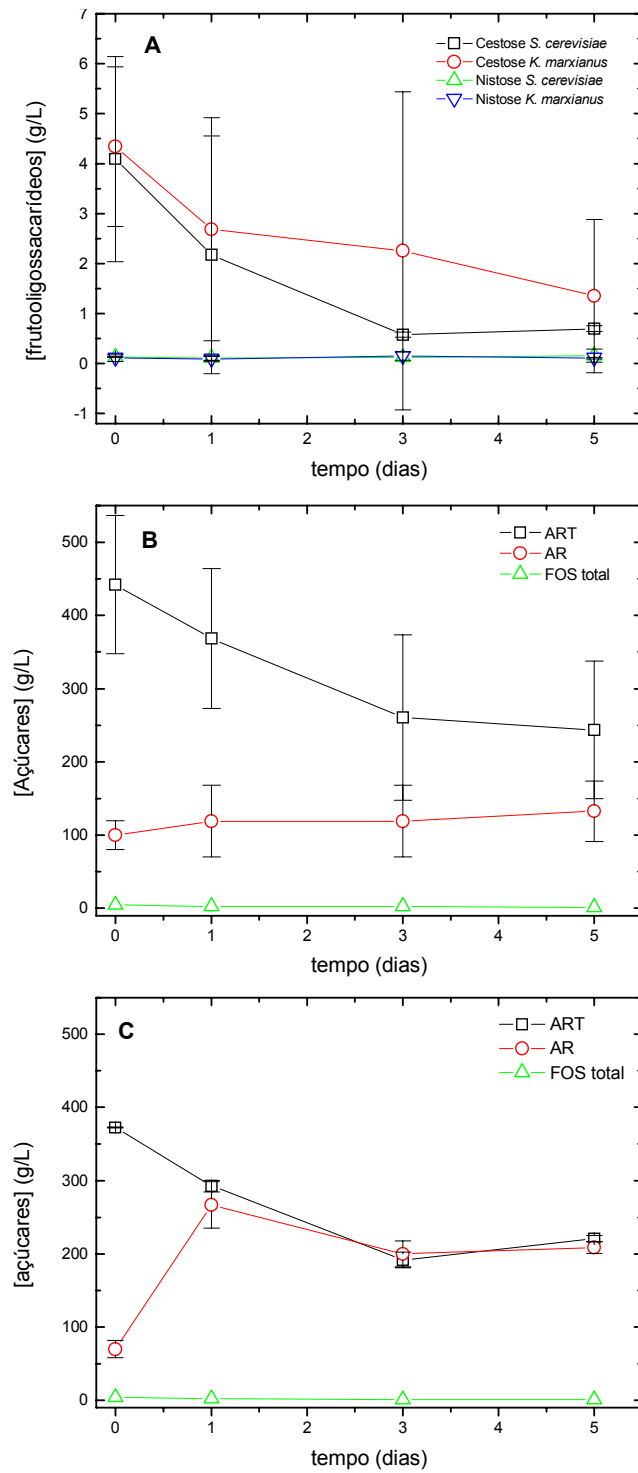


Figura 64 - (A) Produção de FOS (cestose e nistose) e concentração de AR e ART e produção total de FOS por (B) *K. marxianus* e (C) *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio combinado de melão (M50) e sacarose (M2 e M5) a 30°C e 100 rpm

Na Figura 15 estão apresentadas as análises de FOS por cromatografia em papel, após cultivo da levedura *S. cerevisiae* em meio combinado contendo melaço (M50) e sacarose (M2 e M5). Através da análise destes resultados é possível observar indícios de pequenas quantidades de FOS, visualizadas no cromatograma, quando comparado com o padrão comercial de FOS.

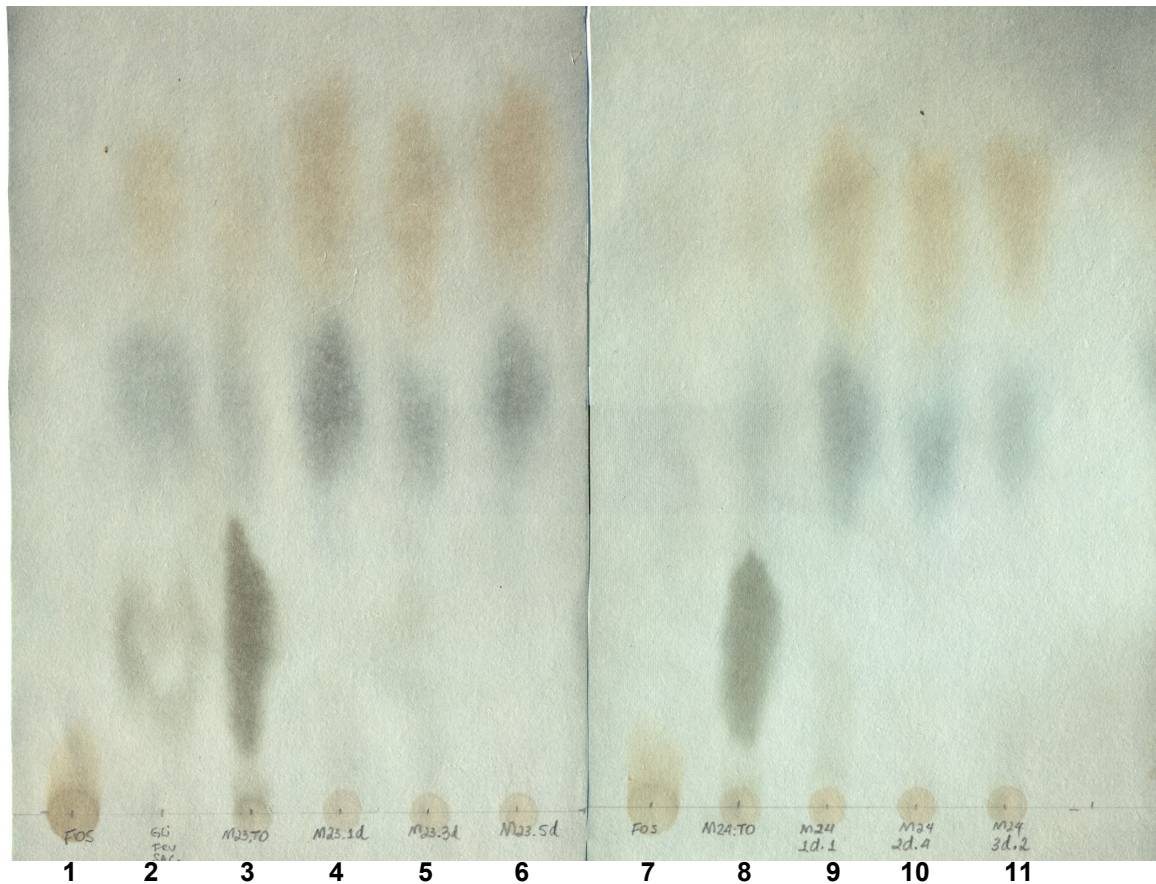


Figura 75 - Análise qualitativa de frutooligosacarídeos por cromatografia em papel, produzidos durante cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio combinado de melaço (M50) e sacarose (M2 e M5). Padrões: (1) e (7) FOS amostra comercial 5%; (2) Frutose 5%, glicose 5% e sacarose 5%; (3) e (8) tempo zero; (4) e (9) 1 dias de cultivo; (5) e (10) 3 dias de cultivo; (6) e (11) 5 dias de cultivo.

Na Figura 16 estão apresentadas as análises de FOS por cromatografia em papel, após cultivo da levedura *Kluyveromyces marxianus* em meio combinado contendo melaço (M50) e sacarose (M2 e M5). Através da análise destes resultados é visível a produção de FOS ao longo dos 5 dias estudados, quando comparado com o padrão comercial de FOS.

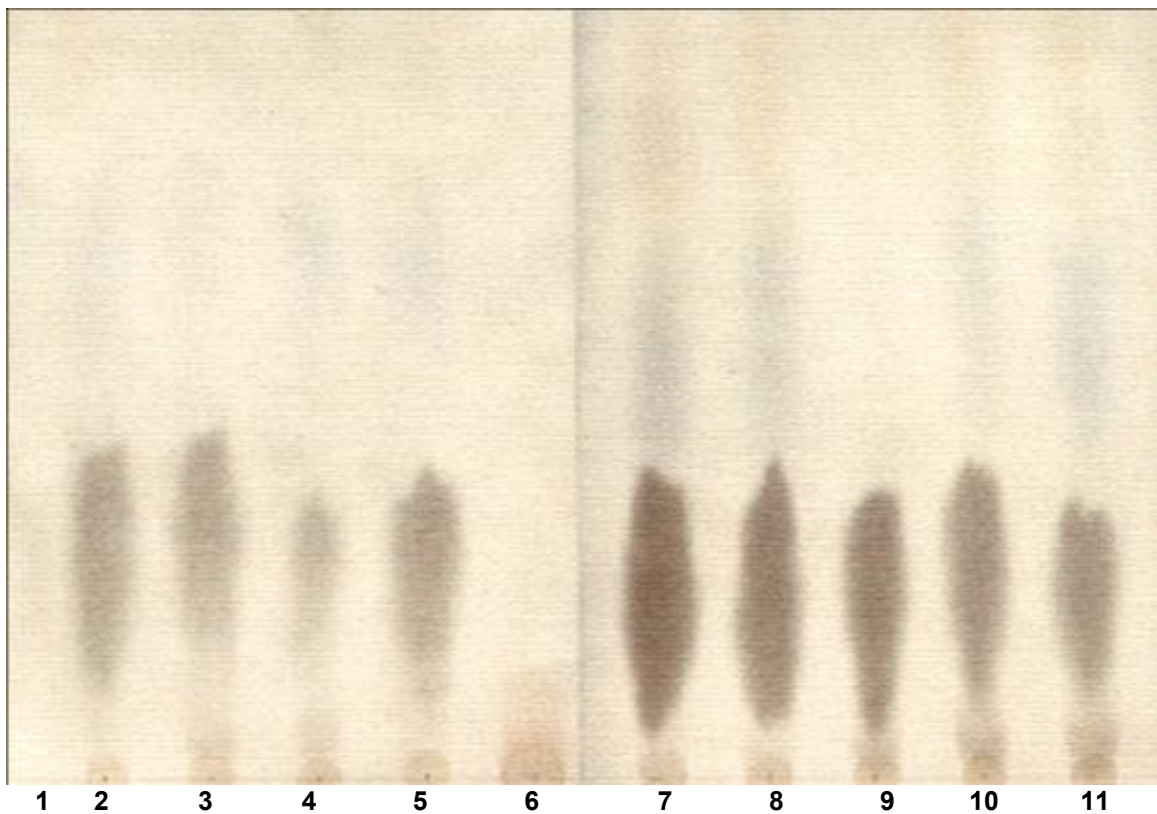


Figura 86 - Análise qualitativa de frutooligosacarídeos por cromatografia em papel, produzidos durante cultivo de células de *Kluyveromyces marxianus* em meio combinado de melaço (M50) e sacarose (M2 e M5). Padrões: (6) FOS amostra comercial 5%; (2) e (7) Frutose 5%, glicose 5% e sacarose 5%; (3) e (8) tempo zero; (4) e (9) 1 dia de cultivo; (5) e (10) 3 dias de cultivo; (6) e (11) 5 dias de cultivo

A Figura 17 baixo, apresenta valores de FOS total (soma dos açúcares cestose e nistose) após cultivo de *K marxianus* ou *S. cerevisiae* em meio combinado contendo melaço. Para os dois microrganismos, observa-se consumo de frutoligossacarídeo a partir de tempo zero até o quinto dia. Para *K. marxianus*, tem-se menor perda de FOS em relação ao outro microrganismo.

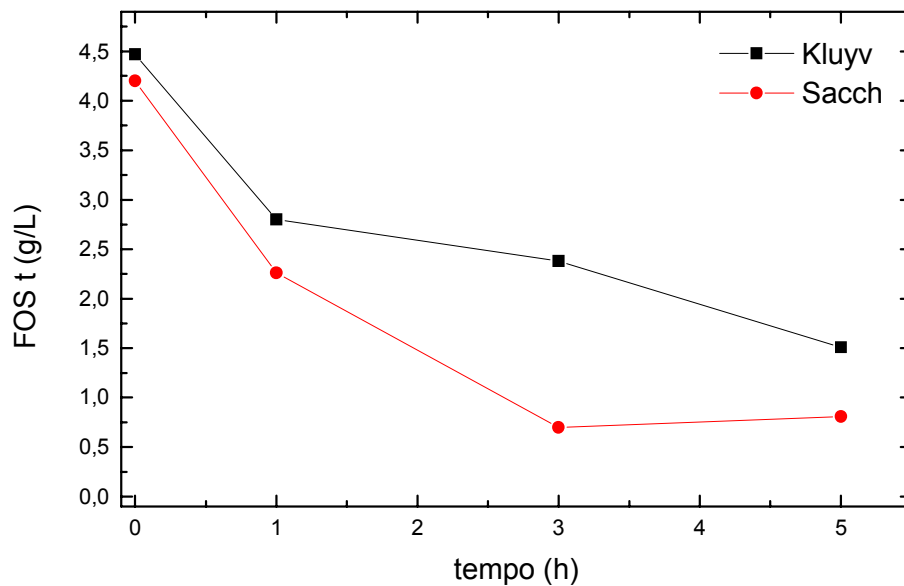


Figura 97 - Produção de FOS total (cestose + nistose) por *K marxianus* e *S. cerevisiae* após cultivo das leveduras em meio combinado de melaço (M50) e sacarose (M2 e M5) a 30°C e 100 rpm

5 CONCLUSÃO

A produção de FOS por leveduras em meios contendo sacarose ocorreu mas em pequena quantidade, neste caso o FOS produzido foi a cestosose (GF2). Estes valores só puderam ser obtidos após análise por cromatografia líquida. Ainda assim, os valores obtidos de cestosose após um dia de cultivo de *K. marxianus* foram mais elevados que para a *S. cerevisiae*.

Em meios contendo melaço foi observada quantidade de FOS no tempo inicial, sem o cultivo das leveduras.

O meio que apresentou uma quantidade maior em relação as outros meios, sacarose ou melaço, de frutooligossacarídeos (FOS) foi o meio combinado de melaço (M50) e sacarose (M2 e M5). Esta interação potencializou um aumento na quantidade de FOS, porém houve consumo e não produção de frutooligossacarídeos como visto anteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V. (Org.) ; LEÃO, Regina Machado (Pesq.). **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações, 2005. 448 p.
- BORNET, F.R. Undigestible sugars In food products. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 59, n. 3, p. 763S-769S, Mar. 1994.
- BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2007.
- BUTOLO, J. E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras fontes de nutrientes. In: WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: utilização em alimentação humana e animal, 1996, Campinas. **Anais....** Campinas: Ital, 1996. p. 70-86.
- CAZETTA, M. L.; MARTINS, P. M. M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Food Engineering**, Essex, V. 66, n. 3, p. 301-305, Feb, 2005.
- COPERSUCAR. Centro de Tecnologia Copersucar, CTC – Divisão Industrial, CTDI. Fermentação, Piracicaba, 1987. 434 p.
- CRUZ, S.H. **Efeito da natureza da fonte de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em microrganismos: estudos enzimáticos e fisiológicos com leveduras Crabtree positivo e negativo**. 2002. 133p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química , Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- CRUZ, R.; CRUZ, V.D.; BELINI, M.Z.; BELOTE, J.G.; VIEIRA, C.R. Production of fructooligosaccharides by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, Great Britain, v. 65, p.139-143, Jul. 1998.
- DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, New York, v.18, p. 499-514, Oct. 2000.
- GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO. J.L. **Fungos**, Caxias do Sul: EducS, 2004, cap. 4, p. 125-169.
- GROOTWASSINK, J.W.D.; HEWITT, G.M. Inducible and constitutive formation of -frutofuranosidade (inulinase) in batch and continuous culture of the yeast *Kluveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 31-41, 1983.

HARTEMINK, R., VANLAERE, K.M.J., ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, Wageningen, v. 38, n. 3, p.367-374, Aug. 1997.

HIDAKA, H. et al. Effects of fructooligosaccharids on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora**, Toio, v.5, p.37-50, 1986.

HIDAKA H., EIDA T., TAKIZAWA T., TOKUNAGA T., TASHIRO Y. Effects of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora**, Toio, v. 5, n. 1, p. 37-50, 1986.

HONDO, M.; OKUMURA, Y.; YAMAKI, T. A preparation of yacon vinegar containing natural fructooligosaccharides. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, Hokkaido, v.47, n.10, p.803–807, 2000.

IZZO, M.; NINESS, K.R. Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. **Cereal Foods World**, Malvern, v.46, n.3, p.102–106, Mar. 2001.

KANG, S.; CHANG, Y.J.; OH, S.J.; KIM, S. Purification and properties of an endo-inulinase from *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 20, n. 10, p. 983-986, Oct. 1998.

LEE, S.S; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, New York, v. 11, p. 641-649, May. 1981

LEITÃO, R.F.F.; PIZZINATTO, A.; VITTI, P.; SHIROSE, I.; MORI, E.E.M. Estudos de duas cultivares de triticale e sua aplicação em produtos de massas alimentícias (macarrão, biscoito e bolos). **Boletim ITAL**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 325-334, 1984.

LIMA, L.P.C. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. (Coord.) **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975a. v. 1, cap.1, p. 1 – 18 (Biotecnologia).

LIMA, U. A. Produção de solventes. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. (Coord.) **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975b. v. 1, cap.1, p. 88– 100 (Biotecnologia).

MAIORANO, A.E.; PICCOLI, R.M.; SILVA, E.S.; RODRIGUES, M.F.A. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 30, n. 11, p. 1867-1877, Nov. 2008.

MARKL, H., ZENNECK, C., DUBACH, A.H.; OGBONNA, J.C. Cultivation of *Escherichia coli* to high cell density reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 39, p. 48-52, Apr. 1993.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n.3, p. 426-429, Mar. 1959.

MILNER, J.A. Functional food and health promotion. **Journal of nutrition**, Madison, v. 129 Suppl., p.1395S-1397S, Jul. 1999.

MODLER, H. W.; MCKELLER, R. C.; YAGUSHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 23, p.29-41, 1990.

MORO, G.; MINOLI, I; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-related effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v.34, n.3, p.291–295, Mar. 2002.

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Fructooligosaccharides: implications in human health being and use in foods. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, Abr. 2003.

PARK, Y. K. Produção de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. (Coord.) **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. V.1, cap.1, p. 182 – 211 (Biotecnologia).

PARK, J.P.; BAE, J.T.; YOU, D.J.; KIM, B.W.; YUN, J.W. Production of inulooligosaccharides from inulin by a novel endoinulinase from *Xanthomonas* sp. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 21, n. 12, p. 1043-1046, Dec. 1999.

REVILLA, J. G.; COOPAT, T.S.; Leveduras Saccharomyces. In: ICIDCA. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Brasília: ABIPTI, 1999. cap. 4.8, p. 267-271.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparin their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 33, n. 2, p.103-108, Feb. 1993.

ROBERFROID, M.; VAN LOO, J., GIBSON, G.R. (1998) The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 128, n. 1, p. 11-19, Jan. 1998.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007. 133p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ROMBLA, M.O.; PRADA, A.R.; COOPAT; T.S.; CARRACEDO, G.B., Méis. In: ICIDCA. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Brasília: ABIPTI, 1999. cap. 2.4, p. 49-55.

SANTOS, A.M.P.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluveromyces marxianus*. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 45, n 2, p. 181-186, Jun. 2007.

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

SIGMA ALDRICH. **Enzymatic Cell Lysis and Protoplast Preparation**: Enzymes for Yeast Cells. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Lysing_Enzymes.html. Acesso em: 11 fev. 2007.

SPIEGEL, J.E., ROSE, R., KARABELL, P. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, Boston, v. 48, p. 85-89, 1994.

TOMOTANI, E.J. **Imobilização da invertase em resina de troca iônica (tipo Dowex): seu uso na modificação da sacarose**. São Paulo, 2002. 161p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

TOSSETO, G.M. **Influência da matéria prima no comportamento cinético de leveduras na produção de etanol**. 2002. 95 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ÚNICA, 2008. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/referencia/estatisticas.jsp>. Acesso em: 19 set. 2008.

VISWANATHAN, P.; KULKARNI, P.R. *Saussurea lappa* (kuth) as a new source of inulin for fermentative production of inulinase in a laboratory stirred fermenter. **Bioresource Technology**, Essex, v. 52, n. 2, p. 181-184, Apr. 1995.

WHEALS, A. **Scanning electron micrograph of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Disponível em: <http://www.bath.ac.uk/biosci/wheals2.htm>. Acesso em: 15 fev. 2007.

WIKIPEDIA. **Bild**: Neubauer Improved Counting Chamber. Disponível em: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Neubauer_improved_counting_chamber.jpg. Acesso em: mai. 2008.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, New York, v. 19, p. 107-117, Aug. 1996.

ANEXOS

Tabela 3. Resultados obtidos por *Saccharomyces cerevisiae*, meio Melaço (M50)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	0	333,83	68,02	87,73	1,36	0,08
1	2,57	270,32	219,25	79,32	0,1	0,1
2	3,05	229,77	198,23	68,9	0,61	0,1
3	3,1	218,53	243,14	66,85	0,58	0,12

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M50: 50% Melaço

Tabela 4. Resultados obtidos por *Saccharomyces cerevisiae*, meio Sacarose (M20)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	0,03	224,41	2,22	58,17	0,56	*
1	5,27	124,54	121,15	40,9	0,7	*
2	6,21	85,18	81,74	30,65	0,43	*
3	6,19	80,18	80,05	20,64	0,42	*

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M20: 20% Sacarose.

Tabela 5. Resultados obtidos por *Saccharomyces cerevisiae*, meio combinado de Sacarose (M2 e M5).com Melaço (M50)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	0,98	372,36	69,9	86,67	4,09	0,11
1	4,01	292,48	266,94	90,9	2,18	0,1
3	4,92	191,61	199,78	58,31	0,58	0,15
5	4,21	221,01	208,49	14,49	0,7	0,11

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M2: (2% Sacarose) e M5 (5% Sacarose) com M50 (50% Melaço).

Tabela 6. Resultados obtidos por *Kluyveromyces marxianus*, meio Melaço (M50)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	1,89	395,46	82,7	80,5	1,14	0,1
1	4,86	227,03	216,96	83,93	0,45	0,13
2	6,67	214,3	216,45	90,07	0,51	0,15
3	8,7	163,69	157,06	89,16	0,59	0,17

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M50: 50% Melaço.

Tabela 7. Resultados obtidos por *Kluyveromyces marxianus*, meio Sacarose (M20)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	0,2	203,14	10,07	83,78	0,6	*
1	5,79	121,83	124,57	57,63	1,21	*
2	7,29	75,73	77,31	47,29	0,5	*
3	7,63	87,56	47,98	77,82	0,63	*

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M20: 20% Sacarose.

Tabela 8. Resultados obtidos por *Kluyveromyces marxianus*, meio combinados de Sacarose (M2 e M5).com Melaço (M50)

Dias	Biomassa	ART	AR	VIA	cestose	nistose
0	0,73	442,22	99,94	67,53	4,34	0,13
1	4,72	368,6	119,17	89,86	2,69	0,11
3	7,01	260,69	119,17	76,65	2,26	0,12
5	6,86	243,65	132,55	77,36	1,35	0,16

ART: Açúcares redutores totais; AR: Açúcares redutores; VIA: Viabilidade celular; Cestose (GF₂) e Nistose (GF₃): Frutooligossacarídeos; M2: (2% Sacarose) e M5 (5% Sacarose) com M50 (50% Melaço).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)