

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

JULIANA BUENO DA SILVA

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS OSMOFÍLICOS ISOLADOS DE
FAVO-DE-MEL PARA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS
POR FERMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Campinas
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38s Silva, Juliana Bueno da
Seleção de microrganismos osmofílicos isolados de favo-de-mel
para produção de frutooligosacarídeos por fermentação / Juliana
Bueno da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Frutooligosacarídeos. 2. Microorganismos. 3. Osmofílicos.
4. Fermentação. 5. Sacarose. 6. Melaço. I. Pastore, Gláucia
Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Screening of osmophilic microorganisms isolated from honeycomb for
fructooligosaccharides production by fermentation

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fructooligosaccharides, Microorganisms, Osmophilic,
Fermentation, Sucrose, Molasses

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Luiz Carlos Basso

Mário Roberto Maróstica Junior

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
(Membro)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
(Membro)

Dedico este trabalho aos meus grandes amores Celso e Ana Julia, por serem simplesmente tudo na minha vida, amor, alegria e felicidade. Dedico também aos meus pais Anna e Newton e ao meu irmão Renato pelo apoio, amor e carinho sempre dedicados à mim. Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos, à UNICAMP e ao CNPQ por possibilitarem a realização deste trabalho e permitirem meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À professora Gláucia, pela oportunidade e compreensão, para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por sua amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pelas correções e sugestões apresentadas, pela amizade e apoio ao projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior, pelas correções e sugestões apresentadas.

Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos, Prof. Dr. Yong Kun Park, Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo, Prof. Dr. Marcelo Prado e à Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy por auxiliarem indiretamente na minha pesquisa, sendo decisivos no desenvolvimento deste trabalho.

A equipe de funcionários do Laboratório de Bioaromas, Angélica, Dora, Nadir, Cícera, Bruna e Silvana e aos colegas Junio, Rosângela, Mariana, Mário, Cedenir, Cecília, Molina, Fábio, Ana Paula, Juliano, Dani Bio e Dani Rodrigues, Adriane, Dr. Credidio, Renatinhas, Naiara, Camila, pela amizade, ajuda e convívio.

Ao meu amigo Osmar, pela amizade, ajuda e orientação nas análises de identificação dos microrganismos.

A Deus e Nossa Senhora por terem abençoado minha vida, me trazendo muita felicidade e paz ao longo deste curso.

A Fé e a Alegria são os combustíveis que
possuem a energia capaz de transformar
uma visão do conhecimento em realidade.

(Celso Tomazin Jr)

RESUMO

Os frutooligossacarídeos (FOS) pertencem ao grupo dos prébióticos, que são oligossacarídeos não digeríveis, porém fermentáveis pelas bactérias presentes no trato intestinal e promovem seletivamente o crescimento das bactérias benéficas pertencentes ao grupo dos *Lactobacillus* e das *Bifidobactérias*. Proporcionam uma série de benefícios à saúde humana, como a manutenção da microbiota intestinal, ativação do sistema imune, aumento da síntese de vitaminas do complexo B, redução de colesterol sérico e até o auxílio na prevenção de alguns tipos de câncer. Podem ser extraídos de alimentos vegetais, serem sintetizados a partir da catálise enzimática, com enzimas de fontes vegetais e microbianas ou produzidos por fermentação microbiana, utilizando a sacarose em altas concentrações como substrato. Comparativamente à produção por enzimas vegetais e pela extração, a produção FOS pela via microbiologia é mais produtiva. Sendo assim, o presente trabalho teve objetivo isolar linhagens microbianas osmofílicas, as quais são adaptadas às altas concentrações de açúcares, que apresentassem um alto rendimento e facilidade no processamento para produção de FOS. Para isso amostras de favo de mel e frutas do cerrado foram utilizadas no isolamento de linhagens microbianas osmofílicas, as quais foram selecionadas e avaliadas na produção de FOS através da fermentação submersa. A fermentação foi realizada em meio sintético de sacarose e a base de melaço de cana com o intuito de utilizar um substrato alternativo e de baixo custo para o processamento. Foram selecionadas quatro linhagens, as quais foram identificadas pela metodologia molecular do gene ribossomal 16S para bactéria e 18S para os fungos. Dois fungos filamentosos foram identificados como *Penicillium sp.*, um fungo unicelular como *Aureobasidium pullulans* e uma bactéria como *Bacillus sp.* Todas as linhagens selecionadas apresentaram altos rendimentos na fermentação para produção de FOS, acima de 50%, assemelhando-se aos rendimentos atingidos na produção industrial. A linhagem *Aureobasidium pullulans* LBJBS03 se destacou por apresentar alta produtividade, alto rendimento em menor tempo de fermentação e por ser um microrganismo de fácil manipulação e processamento. Os rendimentos na produção de FOS total atingiram 60,07% para o meio sintético de sacarose e 40,8% em meio de melaço. Outro destaque foi a linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02, a qual atingiu valores de rendimento em torno 70% em meio de sacarose e 40% em meio a base de melaço. Este trabalho mostrou que a produção de FOS pela fermentação pode ser viabilizada, trazendo vantagens por ser um processo mais barato e mais rápido.

Palavras-chaves: frutooligossacarídeos, microrganismos, osmofílicos, fermentação, sacarose, melaço.

ABSTRACT

The fructooligosaccharides (FOS) belong to the prebiotics group. That are oligosaccharides not digerable but fermentable by the bacteria wich lives in the gut microbiota. They promote selective growth of the beneficial bacteria which are Lactobacilli and Bifidobacteria and bring much beneficial to human health, like the maintenance to intestinal microbiota, increasing of synthesis of B vitamin, reduction of serum cholesterol and prevent some kinds of cancer. They can be produced by extraction of vegetable foods, enzimatically with vegetable and microbiology enzymes and by fermentation using sucrose as substrate in high concentration. Comparatively with vegetable resouce, the microorganism has many advantages. So, the aim of this work was isolate strains of osmophilics microorganisms that are adaptated to high concentration of sugars that can produce FOS with high yield and can be used easily in the process. The materials used for the isolation of strains were honeycomb and cerrado fruit that was selected for the production of FOS by submerged fermentation. The fermentation was made using synthetic medium by sucrose and molasses to reduce the costs in the process. Four strains was selected and identified by molecular methodology using ribosomal gene 16S for de bacterium and 18S for the fungi. Two filamentous fungi were identified as *Penicillium sp.*, one unicellar fungi as *Aureobasidium pullulans* and one bacterium as *Bacillus sp.* All selected strains showed high yield. The strain *Aureobasidium pullulans* LBJBS03 distinguished from the others to show high productivity, high yield in short time of fermentation and to be easily manipulation and processing microorganism. The yields of total FOS produced was 60,07% in the synthetic sucrose medium and 40,08% in molasses medium. Other distinguished strain was *Penicillium sp.* LBJBS02 that got yield value around 70% of total FOS in sucrose medium and 46% in molasses medium. This work showed the viability of the production of FOS by fermentation bringing advantages being cheaper and quick process.

Key-words: fructooligosaccharides, microorganisms, osmophilics, fermentation, sucrose, molasses.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PREBIÓTICOS..... | 13 |
| 1.2 AÇÃO FISIOLÓGICA DOS FOS | 14 |
| 1.2.1 Prevenção de câncer de cólon | 14 |
| 1.2.2 Melhora do hábito intestinal e maior absorção de nutrientes e síntese de vitaminas do complexo B..... | 14 |
| 1.2.3 Redução do colesterol sérico | 15 |
| 1.2.4 Atuação no sistema imunológico..... | 15 |
| 1.3 FUNCIONALIDADE E APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS | 16 |
| 1.4 MERCADO MUNDIAL DE ALIMENTOS FUNCIONAIS | 16 |
| 1.5 INTRODUÇÃO AOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.5.1 Hidrólise da inulina | 18 |
| 1.5.2 Obtenção de FOS por catálise enzimática | 19 |
| 1.5.3 Enzimas envolvidas na síntese de FOS | 22 |
| 1.5.4 Mecanismo de reações enzimáticas | 23 |
| 1.6 OBTENÇÃO DE FOS POR MICROORGANISMOS..... | 26 |
| 1.6.1 Fermentação submersa para produção de frutooligossacarídeos..... | 28 |
| 1.7 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE FOS | 30 |
| 1.8 PURIFICAÇÃO DE FOS E PRODUÇÃO COM ALTO RENDIMENTO..... | 31 |
| 2. OBJETIVOS | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS OSMOFÍLICOS | 32 |
| 3.2. SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS PRODUTORES DE FRUTOOLIGOSSACARIDEOS..... | 33 |
| 3.2.1 Seleção das melhores linhagens para produção de FOS | 33 |
| 3.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS..... | 34 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.1. Extração de DNA..... | 34 |
| 3.3.2. Amplificação dos genes ribossomais | 34 |
| 3.3.3. Seqüenciamento dos genes ribossomais | 35 |
| 3.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES..... | 36 |
| 3.4.1. Cromatografia em papel | 36 |
| 3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 37 |
| 3.5 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO | 37 |
| 3.6 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, FORMAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 38 |
| 3.6.1. Determinação da atividade enzimática da β -frutofuranosidase | 39 |
| 3.7 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO | 39 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS | 40 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS..... | 40 |
| 4.1.1. Seleção das melhores linhagens para produção de FOS | 41 |
| 4.2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS..... | 43 |
| 4.3. ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS..... | 45 |
| 4.4 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, FORMAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS, ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 48 |
| 4.4.1. <i>Penicilium sp</i> LBJBS01 | 49 |
| 4.4.2. <i>Penicillium sp</i> LBJBS02..... | 52 |
| 4.4.3. <i>Aureobasidium pullulans</i> LBJBS03 | 55 |
| 4.4.4. <i>Bacillus sp.</i> LBJBS04 | 58 |
| 4.5 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO | 59 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5. CONCLUSÕES | 61 |
| REFERÊNCIAS..... | 62 |

1. INTRODUÇÃO

Prebióticos são carboidratos não digeríveis capazes de estimular o crescimento e atividade das bactérias benéficas presentes no cólon, conseqüentemente trazendo benefícios à saúde do hospedeiro.

Segundo Gibson (2004), este é o conceito de prebióticos, pois são capazes de estimular o metabolismo desses microorganismos, sendo a melhor maneira estudada para incrementar as bactérias benéficas do cólon intestinal.

Sendo assim, os prebióticos devem possuir três características importantes:

- 1- resistir aos processos digestivos;
- 2- serem fermentados pelas bactérias presentes no trato intestinal;
- 3- estimularem seletivamente o crescimento e metabolismo das bactérias

benéficas, como as bactérias lácticas, entre elas os *Lactobacillos*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, e *Bificobactérias*.

Fazem parte do grupo dos oligossacarídeos a lactulose, a inulina, os frutooligossacarídeos (FOS), os galactooligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos da soja (rafinose e estaquiose), a lactosacarose, os isomaltooligossacarídeos, os glicooligossacarídeos e os xilo-oligossacarídeos (GINSON, 2004).

Os efeitos benéficos dos prebióticos se devem ao aumento do volume do bolo fecal reduzindo o tempo do trânsito intestinal, prevenindo a constipação, diminuindo a formação de compostos nitrogenados tóxicos, H₂S, compostos carcinogênicos e genotóxicos formados pelos microorganismos indesejáveis (GIBSON, 2004).

A fermentação desses carboidratos resulta nos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como o acetato, o propionato e o butirato que contribuem para baixar o pH do cólon, dificultando o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, o acetato é metabolizado em áreas sistêmicas como o músculo, o propionato é utilizado para gerar ATP e o butirato é utilizado pelas células do cólon como fonte de energia e possui propriedades anti-tumorgênicas (GIBSON, 2004; BRUZZESE et al., 2006).

Quase toda a inulina e FOS ingeridos são fermentados pela microbiota intestinal, sendo convertidos a ácidos graxos de cadeia curta, lactato, biomassa microbiana e gases (hidrogênio, metano e CO₂). Apenas os ácidos graxos são

aproveitados pelo metabolismo do hospedeiro, apresentando um valor calórico muito baixo, estimado entre 1 a 3 Kcal/g (HAULY & MOSCATTO, 2002).

Dentre os oligossacarídeos mais estudados, destacam-se os efeitos prebióticos caracterizados pela mistura de galactooligossacarídeos (GOS) e frutooligossacarídeos (FOS) por aumentar a resposta do sistema imunológico e diminuir a incidência de infecções intestinais em crianças (BRUZZESE et al., 2006).

Gibson (2004) também destaca os frutooligossacarídeos (FOS), os galactooligossacarídeos (GOS) e a lactulose tendo efeitos prebióticos (bifidogênicos) com eficácia comprovada. Para isso, metodologias moleculares para identificar as bactérias presentes na flora intestinal estão sendo utilizadas para comprovar a capacidade desses compostos em aumentar a microbiota desejável no intestino. Essa metodologia traduz um resultado mais significativo dos encontrados nas metodologias de culturas tradicionais, pois permite a identificação de microorganismos ainda não-cultivados e os de difícil cultivo.

1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PREBIÓTICOS

As bactérias pertencentes ao grupo dos probióticos, como os lactobacilos e as bifidobactérias possuem uma preferência por oligossacarídeos a açúcares simples como a glicose. Gibson e Wang (1994) utilizaram 30 espécies de bactérias colonizadoras do intestino e estudaram o crescimento microbiano em meios contendo oligofrutose e glicose. Perceberam que as bifidobactérias crescem melhor em meios contendo frutooligossacarídeos do que em meios contendo apenas na glicose, sendo o contrário observado para *E.coli* e *C. perfringens*. Constataram também que os meios contendo oligofrutose de menor grau de polimerização (DP) mantiveram uma taxa de crescimento melhor em relação aos outros.

É possível comprovar o efeito prebiótico desses açúcares ao verificar a composição da microbiota intestinal de lactentes. Bebês que se alimentavam de leite materno possuíam um número maior bifidobactérias e bactérias lácticas, do que as crianças que mamavam leites formulados, destacando a presença de bactérias do grupo das Enterobactérias e Clostridium (KLESSEN et al., 1997).

Segundo Coppa et al.(2006) o leite materno possui propriedades prebióticas originárias de uma combinação de muitos componentes, como a baixa concentração

de proteínas e fósforo, pela presença de lactoferrina e lactose, nucleotídeos e oligossacarídeos, sendo esta magnitude claramente comprovada pela presença desses oligossacarídeos.

1.2 AÇÃO FISIOLÓGICA DOS FOS

1.2.1 Prevenção de câncer de cólon

Devido à formação de ácidos graxos de cadeia curta (ácido propiônico, butírico e acético), ocorre o abaixamento do pH intestinal, tornando o meio seletivo para o crescimento das bifidobactérias e as bactérias lácticas, inibindo assim o crescimento bactérias do gênero *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campilobacter*, *Listeria*, coliformes, bacteróides, e outras (GIBSON & ROBERFROID, 1995; HAULY & MOSCATTO, 2002; LEMOS, 2008).

Com a diminuição do número de bactérias putrefativas no intestino, diminui também à ocorrência de substâncias tóxicas, contribuindo na prevenção de câncer de cólon. Gibson e Wang (1995) comprovou o aumento das bifidobactérias e das bactérias lácticas com a administração de inulina e oligofrutoses, o que causou uma diminuição do pH fecal e criou um microambiente bactericida para as bactérias putrefativas. Sendo assim, fica sugerido que a inibição das lesões neoplásticas no cólon está relacionada com a modulação da microbiota no tecido.

Outro relato indica que as bifidobactérias e lactobacillus produzem bacteriocinas que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (LEMOS, 2008). Outro estudo constatou que o butirato é capaz de inibir a proliferação de um grande número de células in “vitro”, inclusive de células tumorais (GIBSON e ROBERFRIOD, 1995).

1.2.2 Melhora do hábito intestinal e maior absorção de nutrientes e síntese de vitaminas do complexo B

O aumento da população bacteriana faz aumentar a retenção de umidade nas fezes, aumentando a massa fecal, favorecendo o peristaltismo e melhora dos sintomas da constipação (LEMOS, 2008).

O abaixamento do pH intestinal, devido a formação dos ácidos graxos de cadeia curta, faz aumentar a solubilidade dos minerais, sendo mais facilmente absorvidos pelas células da mucosa. Outro benefício é que essas bactérias sintetizam muitas vitaminas do complexo B, que são aproveitadas pelo organismo (LEMOS, 2008).

1.2.3 Redução do colesterol sérico

LEMOS (2008) relata que as bactérias lácticas e as bifidobactérias podem reduzir o colesterol sérico total, aumentar a razão HDL:LDL, por consumirem parte do colesterol que chega ao intestino, diminuindo a quantidade que será absorvida pela parede intestinal.

Haully e Moscatto (2002) relatam que o consumo de FOS e inulina por pacientes hipercolesterolêmicos, fez diminuir os níveis plasmáticos de triacilgliceróis e colesterol, relacionando com a diminuição das enzimas lipogênicas hepáticas.

1.2.4 Atuação no sistema imunológico

Os prebióticos podem aumentar a resistência intestinal e extraintestinal contra patógenos atuando na modulação do sistema imunológico. Também podem diminuir reações alérgicas e induzir um efeito de barreira no intestino gerando benefícios para o metabolismo. Contudo há necessidade de mais estudos clínicos na área (BRUZZESE, et al., 2006).

Lemos (2008) relata que as bactérias lácticas atuam indiretamente no sistema imunológico, pois produzem substâncias com propriedades imuno-estimulatórias, como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos, que interagem com o sistema imune, induzem a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrófaga e a síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial a imunoglobulina IgA. Em seu estudo com ratos, o uso de 100 e 150 mg/kg de FOS aumentou as concentrações no soro das

Imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, concluindo que os FOS melhoraram a resposta imunológico dos ratos.

1.3 FUNCIONALIDADE E APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Além de serem utilizados pela indústria farmacêutica, como suplementos para atletas e em formulações para alimentação infantil, a indústria de alimentos utiliza os frutooligossacarídeos e inulina como ingredientes em muitos alimentos por possuírem propriedades físico-químicas de interesse.

A inulina após a secagem, apresenta-se como um pó branco, amorfo e muito higroscópico, sendo a capacidade de ligação de água e inulina 2:1, ou seja, duas moléculas de água para cada molécula de inulina. Em solução, a inulina aumenta o ponto de congelamento e diminui o ponto de fusão da água, possibilitando a formação de um gel de inulina quando esta representa no mínimo 30% dos sólidos na solução. Esse gel tem característica cremosa e é muito utilizado como substituto da gordura em vários produtos, como bolos, chocolates, embutidos e produtos cárneos (HAULY & MOSCATTO, 2002).

Já os frutooligossacarídeos (FOS), como possuem uma cadeia molecular menor, se solubilizam melhor na água e possuem propriedades similares aos xaropes de glicose e sacarose. São mais solúveis que a sacarose, e possuem de 30 a 50% da doçura desta. São utilizados em produtos lácteos, em produtos de panificação para melhorar a umectância, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, fornecer crocância aos biscoitos com baixo teor de gordura, agir como aglutinante em barras nutricionais de granola e também são utilizados adicionalmente com adoçantes para mascarar o sabor residual do produto (HAULY & MOSCATTO, 2002).

1.4 MERCADO MUNDIAL DE ALIMENTOS FUNCIONAIS

Como status legal, os FOS são considerados ingredientes, e não aditivos alimentares, e considerados fibras dietéticas confirmado pelas autoridades legais de vários países. Nos Estados Unidos possuem o status de GRAS (Generally

recognized as safe), sendo regulamentados pelo FDA (Food and Drug Administration). Já no Japão é categorizado como FOSHU (Food of Specified Health Use) e no Brasil é regulamentado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) apresentado como alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde.

Segundo a ABIA, os principais mercados de alimentos funcionais são o Japão, Estados Unidos e Europa, destacando o mercado americano, que em 1998, foi estimado em US\$ 16,7 bilhões, com crescimento de 10,7% sobre o ano anterior. Em 2005, o valor projetado foi de US\$ 33 bilhões. No caso do mercado mundial, em 1999 o segmento de alimentos funcionais foi calculado em US\$ 32 bilhões e, em 2005, em US\$ 60 bilhões, com taxa anual de crescimento de 11%. Já no Brasil, em 2005, o mercado foi avaliado em US\$ 600 milhões (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005a).

O mercado de oligossacarídeos, em particular os frutooligossacarídeos, vem se destacando devido os muitos benefícios e pelo aumento da demanda dos consumidores por esses alimentos. A média do consumo diário desses compostos está entre 1 a 4 g nos Estados Unidos, 3 a 11 g na Europa, na Holanda de 2 a 12 g/dia per capita e no Japão o consumo está estimado em 13,7 mg.Kg⁻¹ dia⁻¹.

No Japão foi estipulado um consumo diário aceitável em torno de 0,8g Kg⁻¹ de peso corpóreo por dia. No Brasil a ANVISA estipulou que o produto contendo FOS não deve ultrapassar 30g desses na sua recomendação diária (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005a; PASSOS & PARK, 2003; YUN, 1996).

1.5 INTRODUÇÃO AOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos podem ser produzidos a partir de fermentação com células microbianas e por meio de catálise enzimática, com enzimas de origem microbiana e vegetal. Também podem ser obtidos pela hidrólise da inulina presentes em muitos alimentos de origem vegetal.

1.5.1 Hidrólise da inulina

Há muitos alimentos que são fontes naturais de FOS. A tabela 1, abaixo, apresenta esses alimentos e a concentração FOS e de inulina presentes.

Tabela1: Concentração de FOS e inulina presentes em alimentos.

| fonte | % inulina | % FOS |
|----------------------------|------------------|------------------|
| cevada | 0,5 – 1,5 | 0,15 - 0,5 – 1,5 |
| tomate | ND | 0,15 |
| cebola | 2-6 | 0,23 – 2 - 6 |
| banana | 0,3-0,7 | 0,30 – 0,7 |
| Açúcar | ND | 0,30 |
| mascavo | | |
| centeio | 0,5 – 1,0 | 0,50 – 1,0 |
| alho | 9-16 | 0,60 – 3 - 6 |
| mel | ND | 0,75 |
| Alcachofra de Jerusalém | 16 - 20 | 10 -15 |
| chicória | 15-20 | 5 - 10 |
| Alho-poró | 3-10 | 2 - 5 |
| Dente de Leão | 12 - 15 | ND |
| Yacon | 3 - 19 | 3 - 19 |
| Trigo | 1- 4 | 1 – 4 |

Fonte: adaptado de Sanguetta, Ramesh e Prapulla, (2005a) ; Haully e Moscatto (2002). ND - não dimensionado.

A inulina contém unidades D-frutossil unidas por ligações osídicas β -1,2, o que permite produzir os frutooligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática desta molécula (MONSAN & PAUL, 1995). Muitos autores diferenciam os FOS da inulina de acordo com o grau de polimerização (DP) da molécula. Os frutooligossacarídeos são moléculas de até 10 DP e inulina moléculas maiores. (YUN, 1996).

Os frutooligossacarídeos produzidos a partir da hidrólise da inulina consistem de unidades lineares de grupamentos frutossil com ou sem uma molécula de glicose na porção final. Este produto é comercializado como “Raftilose”, produzido pela Orafiti Ltda, Bélgica, ou como “Frutafit”, produzido pela Imperial Suikner Unie, Holanda (PASSOS & PARK, 2003).

A figura 1 apresenta o fluxograma de produção de FOS a partir da hidrólise da inulina (TUOHY et al., 2005).

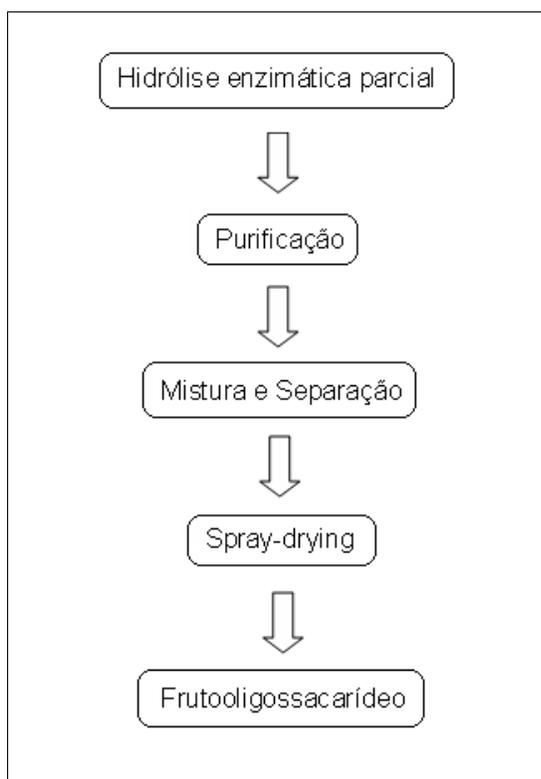


Figura 1: Fluxograma de Produção de FOS obtido da hidrólise enzimática da inulina.

1.5.2 Obtenção de FOS por catálise enzimática

Há também como produzir FOS enzimaticamente a partir de enzimas vegetais e microbianas. Dependendo da fonte enzimática os FOS podem diferir-se pelo tamanho da cadeia e pela ligação entre as moléculas de açúcares. Exemplos de fontes enzimáticas vegetais são as originárias dos aspargos, cebola, alcachofra de

Jerusalém, beterraba e outras. Exemplos de fontes microbianas são *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Fusarium sp.* e outros (Yun, 1996).

Contudo, a produção FOS pela via enzimática originária dessas plantas resulta num baixo rendimento por serem plantas sazonais e possuírem baixa produção, limitando bastante a sua utilização. Sendo assim a produção de FOS a partir de fontes enzimáticas microbianas, principalmente de *Aspergillus* e *Aureobasidium*, é mais vantajosa (YUN & SONG, 1999).

Comparando os vegetais e os microrganismos como fontes de enzimas, os vegetais sempre possuem limitações na produção, pois pouca enzima é extraída de uma grande massa de vegetal, além dos problemas de sazonalidade na produção desses alimentos, como citados acima. As enzimas microbianas não sofrem esse tipo de limitações, pois são produzidas através do cultivo em substratos e em condições apropriadas, podendo ter produção ilimitada (YUN, 1996)

A indústria Meiji Seika Ltda, Japão, produz frutooligossacarídeos utilizando enzimas imobilizadas de *Aspergillus niger*. Este produto é comercializado como “Neosugar”, “Profeed”, “Meiologo”, ou “Nutraflora”. Outro exemplo é a Cheil Foods & Chemicals Co., Coréia, que utiliza enzimas imobilizadas de *Aureobasidium pullulans* (YUN, 1996; PASSOS & PARK, 2003).

No Brasil há a comercialização dos FOS conhecidos como “newsugar”, o qual é processado a partir da beta-frutofuranosidase de *Aspergillus niger*. Este processo é patenteado pela Usina da Barra S/A, tendo como inventores a Dra. Gláucia Maria Pastore e o Dr. Yong Kun Park, professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas. (Usina da Barra S/A, 1997).

A produção via catálise enzimática microbiana está esquematicamente apresentada na figura 2, abaixo (SANGUEETA, RAMESH e PRAPULLA, 2005a).

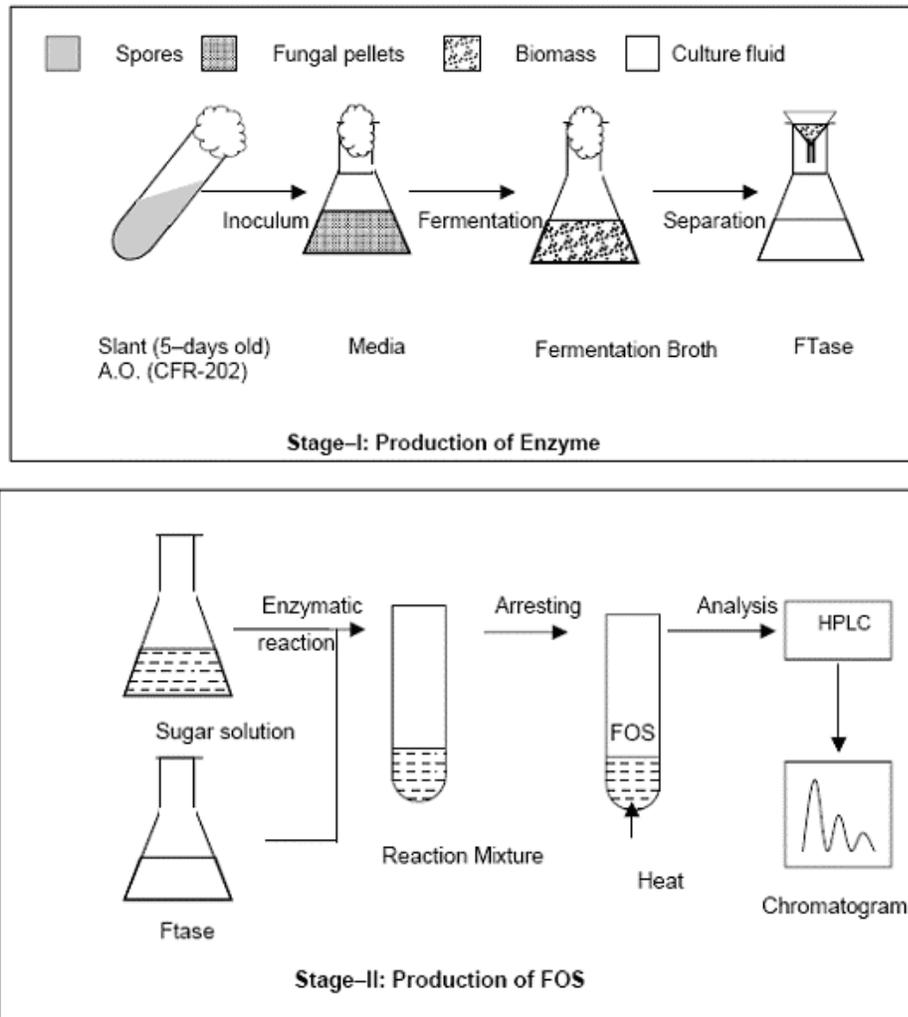


Figura 2: Etapas da produção pela catálise enzimática microbiana.

1.5.3 Enzimas envolvidas na síntese de FOS

Os principais tipos de enzimas utilizados para catalisar as reações de síntese de oligossacarídeos são as hidrolases (glicosidases: EC 3.2) e as transferases (glicosil-transferases: EC 2.4.), sendo a maioria dessas enzimas de origem microbiana (MONSAN & PAUL, 1995).

A nomenclatura das enzimas produtoras de FOS fica dividida. Alguns autores a nomeiam de β -D-frutofuranosidase, classificada como hidrolase (EC.3.2.1.26) e outros de frutossiltransferase, classificada como uma transferase (EC.2.4.1.9). O motivo de nomearem de maneira diferente é devido a alguns quererem ressaltar a atividade de transferência e não a de hidrólise, mesmo já constatado que a enzima frutofuranosidase possui a capacidade de síntese de oligossacarídeo (YUN, 1996).

Segundo Straathof (1986), a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou atividade de transfrutossilacção a partir da concentração molar de 0,29M. Foram formados trissacarídeos não redutores como 1-kestose, 6-kestose e neokestose, o que comprova a capacidade de síntese da invertase.

1.5.3.1. Glicosidases (E.C.3.2.): são capazes de catalisar a hidrólise de ligações osídicas e também de sintetizá-las.

A reação de síntese pode ocorrer de duas formas: por reversão da reação de hidrólise ou por transferência de uma unidade glicosídica de um doador para um acceptor (transglicosilação) (HERNALSTEENS, 2006).

- Reversão da reação de hidrólise:

Sua ação dependerá das condições do sistema de acordo com a lei do efeito de massa (law of mass effect), ou seja, é possível mudar o equilíbrio da reação de hidrólise para síntese aumentando a concentração do substrato, diminuindo a atividade de água ou removendo o produto da reação (precipitação, extração e transformação em outro produto) (MONSAN & PAUL, 1995).

- Transglicosilação:

Esse tipo de mecanismo ocorre devido à presença de um intermediário da reação (enzima-substrato), o qual catalisa a transferência de uma unidade

glicosídica para uma molécula aceptora que contém um grupamento hidroxílico. A velocidade desse tipo de reação é maior que a da hidrólise reversa (MONSAN & PAUL, 1995; HERNALSTEENS, 2006).; HERNALSTEENS, 2006).

1.5.3.2. Transferases (E.C.2.4.) : Enzimas que catalisam reações de transferência, mesmo em soluções diluídas. A energia necessária para a reação provém da energia da ligação osídica e é armazenada na forma de um intermediário (enzima-substrato) covalente (MONSAN & PAUL, 1995; HERNALSTEENS, 2006).

Podem catalisar reações de transferência intermolecular e intramolecular, exemplos desses tipos de reações são a síntese de neosugar (frutooligossacarídeos), dextranas; e ciclodextrinas, ciclofrutanas e isomaltulase respectivamente (MONSAN & PAUL, 1995).

1.5.4 Mecanismo de reações enzimáticas

Os frutooligossacarídeos diferem de acordo com o tamanho da cadeia e a ligação entre as moléculas de açúcares. Isso dependerá praticamente da atividade enzimática e da origem da enzima.

Esses oligossacarídeos podem ser do tipo 1^F e 6^G. O primeiro tipo são chamados de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil-nistose (GF4), que possuem unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -2,1. A inulina também possui este tipo de ligação, porém tem mais de 10 graus de polimerização, podendo chegar a 35.

Embora não haja uma relação estabelecida entre o seu grau de polimerização e a nomenclatura, é coerente referir-se à molécula com grau de polimerização maior que 10 unidades como inulina, e menor ou igual a 10 unidades como oligofrutose (VALADÃO, 2005).

Essas moléculas estão representadas na figura 3 abaixo:

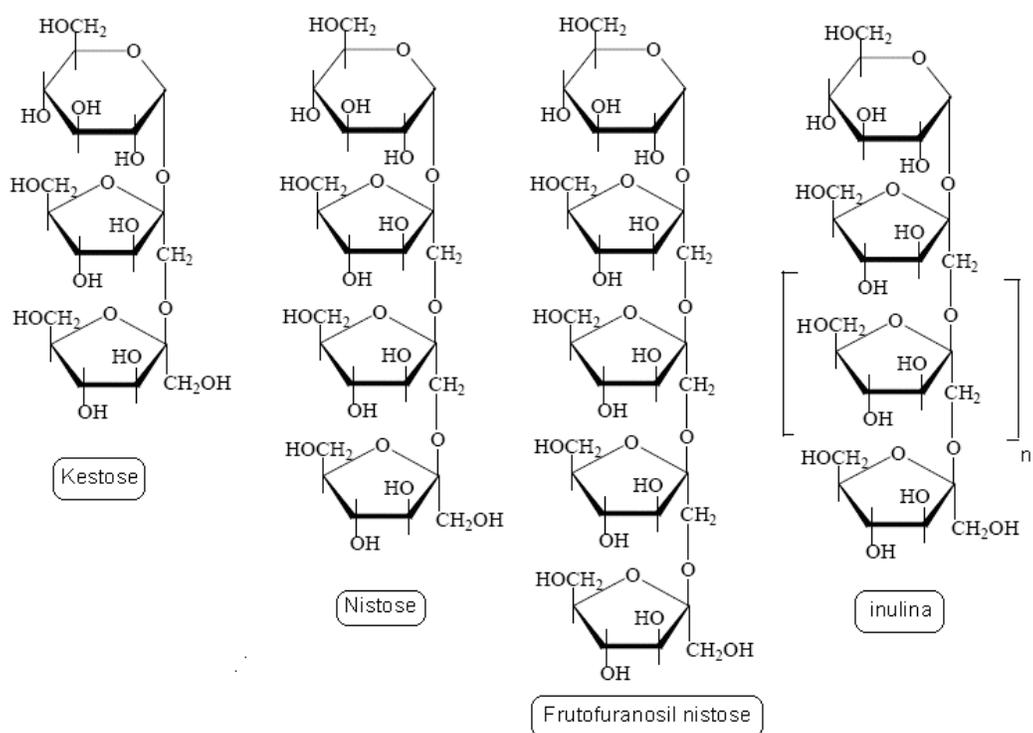


Figura 3: Frutooligossacarídeos do tipo 1^F. Fonte: CÂNDIDO & CAMPOS (1996).

Já os NeoFOS, assim chamados os do tipo 6^G, podem possuir tanto unidades de frutose ligadas entre si por ligações β -1,2, como unidades de frutose ligadas ao carbono 6 da glicose (neokestose) e ao carbono 6 da frutose (6-kestose) (YUN & SONG, 1999; STRAATHOF et al., 1986). As frutanas são moléculas com maior grau de polimerização podendo atingir até 50 DP, que possuem o mesmo tipo de ligação dos neofos. Essas moléculas estão representadas na figura 4 abaixo:

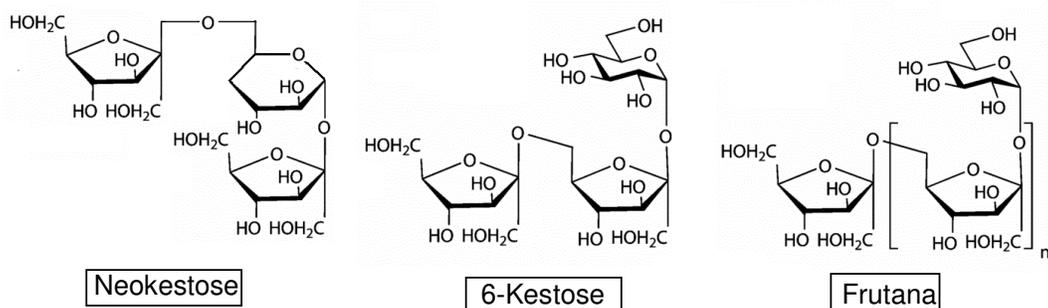


Figura 4: Frutooligossacarídeos do tipo 6^G.

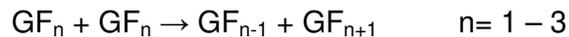
Há também os frutooligossacarídeos de cadeias maiores como GF5 (1^F - β -(frutofuranosil)₄ sacarose) e GF6 (1^F - β -(frutofuranosil)₅ sacarose), produzidos por *Bacillus macerans* (PARK, et al., 2001).

Alguns microorganismos e plantas como, *Claviceps purpurea* e aspargos, produzem tanto FOS do tipo 1^F e do tipo 6^G . Já os microorganismos *Aspergillus* e *Aureobasidium*, produzem apenas os do tipo 1^F (YUN, 1999).

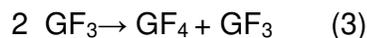
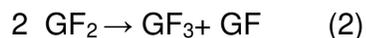
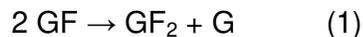
Em plantas e em alguns microrganismos, a síntese de FOS pode envolver uma ou mais enzimas, como alcachofra de Jerusalém que envolve duas enzimas: o trissacarídeo GF2 é formado pela ação da enzima sacarose: sacarose 1^F frutossiltransferase (SST) e os maiores pela ação da frutan:frutan 1^F frutossiltransferase (FFT). Enquanto que na maioria dos microrganismos a síntese envolve apenas uma enzima (YUN, 1996).

Shiomi, Yamada e Izawa (1979) separou e purificou as diferentes enzimas envolvidas na produção de oligossacarídeo do aspargo. Ele distinguiu 3 tipos de frutossiltransferase — sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase, 6^G -frutossiltransferase 1^F -frutossiltransferase.

Jung et al.(1989) propôs um modelo matemático para a ação da frutossiltransferase de *A.pullulans*:



Este mecanismo está dividido em três reações :



Neste modelo a glicose excedente atua como inibidor da enzima.

Duan et al. (1994) propôs um modelo de reação diferente de Jung et al. (1989) em dois pontos: em que a glicose não atua como inibidor da frutossiltransferase quando o substrato é um kestose e nistose e que Jung et al. (1989) não encontrou qualquer inibição pela sacarose e hidrólise da nistose. Os autores ressaltam também que as características da produção enzimática de FOS pela ação da β - frutofuranosidase são similares para os fungos *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Aureobasidium pullulans*, sendo os primeiros produtos formados a 1-kestose e nistose e a formação da frutofuranosil nistose por meio da nistose é substancialmente inibida na presença de glicose.

Segundo Yun (1996), a síntese de FOS é observada durante o cultivo de fungos em meio de sacarose e estes podem ser consumidos como fonte de energia quando o teor de sacarose no meio se torna inadequado. Os oligossacarídeos possuem duas funções durante o processo de fermentação, a primeira é eliminar a frutose livre no meio, que em grandes concentrações, pode implicar num retardo do crescimento microbiano e a segunda seria uma forma de estocar glicose.

Este fenômeno também foi observado por Atiye & Duvnjak (2001), que trabalhou com concentrações de sacarose de 35 a 257 g/L para produção de xarope de frutose e percebeu que a taxa de crescimento diminuiu quando a concentração do substrato aumentou. O estudo mostrou também que uma pequena quantidade de FOS foi produzida no começo do processo fermentativo e consumida totalmente no final da fermentação.

1.6 OBTENÇÃO DE FOS POR MICROORGANISMOS

O processamento de FOS pode utilizar a enzima microbiana e a produção ocorrer por meio de catálise enzimática, ou pode-se utilizar as células vivas e a produção acontecer pela fermentação. Yun et al. (1999) relata os processos fermentativos e enzimáticos com enzimas imobilizadas e células imobilizadas.

Os processos de imobilização celular podem ser de dois tipos. O primeiro utiliza uma ou algumas enzimas contidas nas células, não havendo necessidade de coenzimas (ATP, NADH e outros) e vias anabólicas presentes na respiração celular. Neste processo as células não necessitam estar vivas, apenas o sistema enzimático deve estar ativo (PRADELLA, 2001).

O segundo tipo de processo utiliza células vivas, necessitando manter a viabilidade celular, já que os produtos a serem formados requerem regeneração de coenzimas, presença de cadeia respiratória, vias metabólicas geradoras de intermediários e outros mecanismos inerentes às células vivas (PRADELLA, 2001).

Yun e Song (1999) destacam os processos industriais com enzimas imobilizadas e células imobilizadas em gel de alginato de cálcio utilizados para produção de FOS, e ilustra suas produtividades na tabela 2. No caso das células imobilizadas, o processo não mantém a viabilidade celular, pois as temperaturas de processamento são muito elevadas.

Tabela 2: Exemplos de processos e rendimentos na produção de FOS.

| <i>Tipos de enzimas (mecanismo de reação)</i> | <i>Fonte enzimática</i> | <i>Produtividade (g/L.h)</i> |
|---------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| IC (semicontínuo) | <i>A.pullulans</i> | 45 |
| IC (contínuo) | <i>A. pullulans</i> | 180 |
| IC (contínuo) | <i>Asp. Japonicus</i> | 234 |
| IE (contínuo) | <i>Aureobasidium sp.</i> | 1190 |
| IE (contínuo) | <i>A. pullulans</i> | 1174 |

IC e IE significa células imobilizadas e enzimas imobilizadas

Fonte: YUN e SONG (1999)

Sangueeta, Ramesh e Prapulla (2005a) também apresentam alguns microorganismos utilizados para produzir FOS através da reação enzimática e seus respectivos rendimentos, apresentados na tabela 3:

Tabela 3: Rendimentos da produção de FOS por enzimas microbianas.

| <i>Fonte enzimática</i> | <i>[] substrato (g/L sacarose)</i> | <i>Rendimento (%)</i> |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> AS0023 | 500 | 54 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 700 | 55 |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 400 | 61 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202 | 600 | 58 |
| <i>A. pullulans</i> CFR 77 | 550 | 60 |
| <i>Bacillus macerans</i> EG-6 | 500 | 33 |
| <i>Zymomona mobilis</i> | 500-600 | 24-32 |

Fonte: Sangueeta, Ramesh e Prapulla (2005a)

1.6.1 Fermentação submersa para produção de frutooligossacarídeos

A utilização de processos fermentativos é muito vantajosa em comparação com a catálise enzimática, pois o produto é obtido diretamente no meio de fermentação, podendo este ser um produto primário ou secundário do metabolismo e não se faz necessária a etapa de produção da enzima, eliminando assim custos na produção.

Quando comparadas aos microrganismos, as enzimas isoladas poderão fornecer maiores rendimentos, pois não há presença de substâncias contaminantes, resultantes do metabolismo e lise celular. Contudo, para se comparar economicamente o processo mais viável, é necessário levar em conta custos relacionados à separação e purificação da enzima (VITOLLO, 2001).

Apesar de ser constatado a capacidade de produção de FOS dessa maneira não há quase relatos de produção pela fermentação.

Park et al. (2001) produziu açúcares não convencionais, frutooligossacarídeos e eritritol, a partir de sacarose por transformação microbiana. Neste estudo, utilizou-se uma linhagem de levedura osmofílica *Tricosporon sp.* 400-1, a qual fermentou meios com elevadas concentrações de sacarose e produziu eritritol, GF2 e GF3.

Em outro estudo, utilizou-se a otimização para o processamento de FOS por meio de fermentação alcançando um rendimento de 75,2% com 48 horas de reação, 30°C, 5% de inóculo e pH inicial do meio igual a 7,0 (SUN et al., 2005).

Mais recentemente, encontramos na literatura relatos de outros microrganismos produtores de frutooligossacarídeos e seus rendimentos, conforme a tabela 4:

Tabela 4: Atuais processos e microrganismos estudados para produção de FOS.

| <i>Fonte</i> | <i>Produtividade e forma de produção</i> | <i>Referência</i> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Aspergillus sp</i> N74 | 70 %- Células (fonte intracelular de enzima) | Sánchez et al., 2008 |
| <i>Bacillus circulans</i> OKUMZ 31B | Produção de FOS a partir da enzima cicloinulooligossacarídeo frutanotransferase. | Kawamura e Matsuda, 2008 |
| <i>Pseudomonas aurantiaca</i> + <i>Zimomona mobilis</i> | 24-26%- catálise enzimática. | Byun et al., 2007 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | Enzima extracelular. | Álvaro-Benito et al., 2007 |
| <i>Aspergillus niger</i> St-0018 e <i>Aspergillus foetidus</i> St-00194 | Enzima intracelular dos fungos para produção de FOS e converteu o excedente de sacarose em trealose e palatinose. | Markosyan, et al., 2007 |
| <i>Asregillus aculeatus</i> | 60,7%- Produção pela enzima comercial do fungo purificada. | Ghazi et al., 2007 |
| <i>Klyveromyces marxianus</i> var <i>bulgaricus</i> | 50 g/L -Biorreator com enzima extracelular livre e imobilizada. | Maugeri e Santos, 2007 |
| <i>Rhodotorula sp</i> | 52- 63%- Enzima extracelular | Hernalsteens, 2006 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | Cel. imobilizadas (enzima intracelular) 49 g.L ⁻¹ ; Células inteiras (enzima intra) rendimento de 55%. Síntese de neofos. | Park et al., 2005; Hayashi et al., 2000. |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CFR202 | 58,9 % - Produção da enzima extra e produção de FOS continua | Sangeeta, Ramesh e Prapulla , 2005a. |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CFR202 | 53 % - Fermentação submersa do fungo com reciclo de células pra obtenção da enzima extracelular. Rendimento mantido por 6 ciclos | Sangeeta, Ramesh e Prapulla ,2005b. |
| <i>Streptococcus mutans</i> | Enzimas imobilizadas. | Rozen, Steinberg, Bachrach, 2004; Hicke et al., 1999; |
| <i>Penicillium rugulosum</i> | 80 %- Enzima bruta. | Barthomeuf e Pourrat, 2004 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202 e <i>Aureobasidium pullulans</i> CFR 77 | 50-54% pela enzima extracelular de A. oryzae e 57% pela enzima extracelular de A.pullulans. | Sangeeta, Ramesh e Prapulla, 2004. |
| <i>Aspergillus japonicus</i> CCRC 93007 ou <i>Aurobasidium pullulans</i> ATCC 9348 com <i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 23771 | 80 % - Processo fermentativo contínuo com células mistas das culturas (fontes de FTase e glicose desidrogenase) e um sistema de filtração por membrana para separação dos FOS. | Sheu et al., 2002 |
| <i>Zimomona mobilis</i> | Produção de levana e FOS (30% no total dos açúcares produzidos) por enzima extracelular. | Bekers et al., 2002) |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | Células (enzima intracelular) imobilizadas em glúten, produtividade de 173g/h.L de FOS | Chien, Lee e Lin, 2001 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Estudo da atividade enzimática de transfrutossilação | A.F.T. et al.(2001) |
| <i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> SRT4 | 50 %- Enzima extracelular | Trujillo et al.(2001); Támara et al., 1999 |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 90%-reação utilizou a enzima do fungo junto com glicose oxidase comercial, a qual eliminou a glicose do meio. | Heu et al., 2001 |
| <i>Bacillus macerans</i> EG-6 | Produção seletiva de GF4 (42%); produção de GF5 e GF6 (32,3%) por meio da enzima extracelular em diferentes condições | Park, Oh e Yun, 2001; Kim, Choi e Yun, 1998 |
| <i>Bacillus subtilis</i> C4 | Produção de Fos e levana a partir da enzima extracelular | Euzenat, Guibert e Combes , 1996 |

1.7 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE FOS

Segundo Chen (1998), a produção enzimática pode ser otimizada para o fungo *Aspergillus japonicus*, quando se aumenta o teor de sacarose e quando a fermentação acontece em aeração, sendo esperado por ser um microorganismo aeróbico. Esse trabalho mostrou a influência do meio no crescimento do fungo e formação dos bioprodutos. O meio padrão foi 5% sacarose, 2% extrato de levedura, 2% de NaNO₃, 0,05% de MgSO₄.7H₂O e 0,5% K₂HPO₄. Dentre os nutrientes, o extrato de levedura e a sacarose são os principais componentes na produção enzimática.

Sangueeta, Ramesh e Prapulla (2005a) ressaltam que há dois métodos de fermentação com microrganismos para produzir a enzima frutossiltransferase (Ftase), a fermentação submersa (SmF) e a fermentação em meio semi-sólido (SSF). O segundo tipo é uma forma alternativa de se obter a enzima com um custo reduzido, pois é um processo mais econômico e o processo de purificação é mais simples. Meios alternativos como farelo de trigo, bagaço de cana, subprodutos do milho, bagaço de mandioca e outros resíduos da indústria alimentícia, podem ser utilizados para o crescimento do fungo.

Em um estudo de otimização de processos para obtenção da enzima β-frutofuranosidase, foi utilizado *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida (SSF) em bagaço de cana de açúcar suplementado com sais e em fermentação submersa (SmF). Os resultados obtidos indicaram a possibilidade de produção da enzima em meio semi-sólido com maiores vantagens de produtividade 81,8 U/Litro/h e 58,3 U/Litro/hora para SSF e SmF, respectivamente (ASHOKKUMAR, KAYALVIZHI e GUNASEKARAN, 2001).

A utilização de meios alternativos como substratos para fermentação têm sido estudados para diminuir os custos na produção.

Shin et al. (2004), utilizou melaço (mistura de sacarose com glicose e frutose) como substrato para produzir frutooligosacarídeos. O mecanismo de produção foi a utilização de células de *Aureobasidium pullulans* KCCM 12017 como fonte intracelular da enzima o qual reagiu com melaço (equivalente a 360 g/L de sacarose) a 55°C por 24 horas, obtendo um teor de FOS total a o final da reação de 166 g/L.

1.8 PURIFICAÇÃO DE FOS E PRODUÇÃO COM ALTO RENDIMENTO

Há um grande interesse em produzir xaropes de frutooligossacarídeos com altas concentrações, já que a maioria dos xaropes disponíveis possuem concentrações de oligossacarídeos em torno de 60% (p/v) (YUN & SONG, 1999).

É possível obter um alto teor de FOS, até 98% baseado no teor de sacarose inicial, utilizando um sistema de reação misto com glicose oxidase e β -fructofuranosidase. (YUN, 1996).

Sheu et al., 2001 obteve um rendimento de 90% utilizando a β -fructofuranosidase de *Aspergillus japonicus* e glicose oxidase comercial. A glicose foi precipitada através da formação do complexo gluconato de cálcio entre o ácido glucônico e o carbonato de cálcio presentes no processo.

Outra alternativa para a purificação de FOS é utilizar um sistema de nanofiltração. Estudos de operação dessa tecnologia têm sido realizados teoricamente e tecnicamente para essa técnica (LI et al., 2004)

Nishizawa, Nakajima e Nabetani (2001) obteve altas concentrações de FOS utilizando um sistema membrana de reação com membrana de nanofiltração. Nesse sistema apenas a glicose permeava e não a sacarose, atingindo assim um teor de 90% de FOS total.

Outro estudo utilizou células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* para purificar misturas de fruto, malto, isomalto e inulinoligossacarídeos. O microorganismo fermentou completamente a frutose, a glicose e a sacarose presentes no meio em 12 h sem degradar os oligossacarídeos (CRITTENDEN e PLAYNE, 2002).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar novas linhagens para produção de frutooligossacarídeos, efetuando-se as seguintes etapas:

- isolar microrganismos osmofílicos de favo de mel e de frutas do cerrado;
- selecionar as melhores linhagens para produção de FOS, avaliando os microrganismos isolados e microrganismos pertencentes à coleção do Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- avaliar a produção por meio de fermentação submersa com as linhagens selecionadas;
- utilizar o melaço como substrato alternativo para o processo fermentativo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS OSMOFÍLICOS

Com o intuito de isolar linhagens de microrganismos osmofílicos, foram utilizadas amostras de favo-de-mel, fornecidas pelo Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, coletadas nos apiários da região de Piracicaba, São Paulo. Foram utilizadas também algumas frutas da região do cerrado do Brasil: guapeva, pequi, cagaita e gabioba.

Dessas amostras, alíquotas de mel e pólen e pedaços das frutas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de meio enriquecido, autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos, constituído de 40% sacarose, 1% de extrato de levedura e incubadas a 30°C por 24 horas.

Após esse período, o conteúdo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 50 mL, contendo 10 mL do mesmo meio e incubadas a 30°C, 200 rpm por 72 horas (OLIVEIRA, 1997).

Posteriormente as amostras foram estriadas em placas de Petri com meio estéril contendo 20% sacarose, 1% extrato de levedura e 2 % de agar-ágar e

incubadas a 30°C de 2 a 4 dias, conforme o desenvolvimento da colônia. Cada colônia isolada foi transferida para tubos de ensaio contendo meio YM (Yeast Malt) sólido e PDA (Potato Dextrose Ágar) sólido inclinado, incubadas a 30°C e depois mantidas a 4°C.

A manipulação foi realizada em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar.

3.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE FRUTOOLIGOSSACARIDEOS

Nesta etapa, além das linhagens isoladas do favo-de-mel, foram analisados também microrganismos pertencentes à coleção do Laboratório de Bioaromas (FEA/UNICAMP).

Cada linhagem isolada foi inoculada, sob condições assépticas, em frascos Erlenmeyers contendo 10 mL de meio de cultura, autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos, constituído de 40% sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia, incubadas a 30°C, 200 rpm por 72 horas (adaptado de OLIVEIRA, 1997).

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C e filtradas em papel de filtro Whatman nº1, para os microrganismos que não sedimentavam com a centrifugação. O sobrenadante foi analisado qualitativamente por cromatografia em papel, de acordo com o item 3.4.1 para verificar a produção de FOS.

3.2.1 Seleção das melhores linhagens para produção de FOS

As linhagens foram selecionadas de acordo com o item 3.2, as quais se observou a presença de FOS pela cromatografia em papel, foram submetidas a um novo teste de produção de FOS. O sobrenadante foi analisado qualitativamente por cromatografia em papel, de acordo com o item 3.4.1 e quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme o item 3.4.2. Nesta etapa utilizou-se para a análise apenas a coluna KS 801 (Waters), que separa os compostos por tamanho molecular.

3.3 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS

As análises moleculares para identificação dos organismos isolados, Fungo1-LBJBS01, Fungo2-LBJBS02, Fungo3-LBJBS03 e Bactéria1-LBJBS04, foram realizadas no Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi adaptada do protocolo de Hoisington et al. (1994). As amostras em meio líquido foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm em microcentrífuga de bancada. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 600µL de solução CTAB (0,7M NaCl, 1% CTAB, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0,1% 2-mercaptoetanol). As amostras foram incubadas a 65°C por 60 minutos, com agitação dos microtubos a cada 10 minutos. A seguir, acrescentou-se solução clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1), na quantidade de 600µL por microtubo, seguido de uma nova centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo ao qual foi acrescentado 600µL de CIA, seguido de nova centrifugação. Ao sobrenadante retirado, acrescentou-se 500µL de etanol 100%, mantendo os microtubos por uma hora a -20°C para precipitação do DNA. Após este período, os microtubos foram centrifugados por 12 minutos, ocorrendo assim a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado com etanol 90% por 1 minuto e a seguir com etanol absoluto por mais 1 minuto. Em seguida, com o DNA seco e ressuspendido em 50µl de água estéril, realizou-se uma digestão a temperatura ambiente por 12 horas com 2µL da enzima RNase (1mg/mL) por amostra para degradação de RNA.

3.3.2. Amplificação dos genes ribossomais

Para a amplificação do gene ribossomal bacteriano 16S realizou-se uma reação da polimerase em cadeia (PCR) com as seguintes condições: 20ng de DNA; 2,5µL de tampão 10X (*Invitrogen Life Technologies*); 1U de ThermalAce DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*); 1µL do iniciador universal FD1 (5'AGA

GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e igual quantidade do iniciador RD1 (5'AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') na concentração inicial de 5pmol; 0,2µL de dNTP (10mM) e quantidade de água Milli-Q suficiente para completar 25µL de reação. O programa de amplificação consistiu de 3 minutos de desnaturação a 94°C seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C. Após os 25 ciclos, realizou-se uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR, com aproximadamente 1500 pares de bases, foram purificados utilizando o kit GFX de purificação (*Amersham Biosciences*), conforme instruções do fabricante.

Para a amplificação parcial do gene ribossomal 18S dos isolados de fungo realizou-se uma PCR de maneira semelhante para o gene 16S, exceto pela utilização dos iniciadores NS1 (5'GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3') e NS2 (5'GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC 3') e pela substituição da temperatura de anelamento dos iniciadores para 52°C. Os fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases foram purificados de maneira idêntica para o gene 16S.

3.3.3. Seqüenciamento dos genes ribossomais

Para cada amostra, foram realizadas reações de seqüenciamento em triplicata. Na PCR realizada para o seqüenciamento parcial dos genes ribossomais 16S e 18S utilizou-se 1µL dos iniciadores RD1 (5'AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') e NS1 (5'GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3'), respectivamente, na concentração de 3,2pmol; aproximadamente 400ng de DNA; 2µL de tampão *Save Money* (200mM de Tris-HCl pH 9 e 5mM de MgCl₂); 2µL do kit *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystem*) e quantidade de água Milli-Q suficiente para completar 10µL de reação. O programa consistiu de 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 55°C (para a bactéria) e 52 °C (para os fungos) e 4 minutos à 60°C. Após a reação, o produto foi estocado sob refrigeração à 4°C. Os dNTPs não incorporados foram eliminados por precipitação com álcool isoamílico 75% e etanol 70% gelado.

Após a secagem completa do DNA, acrescentou-se 3µL da solução *Blue Dextran Loading Solution* (*Promega*). Depois de ressuspendido, a solução com DNA foi desnaturada a 95°C durante 5 minutos e imediatamente imersa em gelo até o momento do seqüenciamento, realizado em seqüenciador Prism ABI 377, conforme protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*).

3.3.4. Análise das seqüências

As seqüências foram analisadas pelos programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; GORDON; DESMARAIS; GREEN, 2001). Somente seqüências com ao menos 200 bases com qualidade Phred igual ou maior a 20 (probabilidade de um erro para cada 1000 bases) foram utilizadas.

As seqüências com boa qualidade foram alinhadas pelo programa ClustalX e agrupadas conforme o isolado, formando quatro conjuntos representados pelos nomes Fungo1, Fungo2, Fungo3 e Bactéria1. Estas seqüências foram então submetidas ao banco de dados GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a busca de similaridade com outras seqüências depositadas no banco, através do programa Blastn. Além do banco de dados do NCBI, a seqüência de bactéria também foi submetida ao banco de dados do Ribosomal Database Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e analisadas pelo programa Classifier. Este é um banco de dados exclusivo com seqüências de 16S rDNA e mais confiável que o GenBank para este tipo de amostra.

3.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

As análises qualitativa e quantitativa dos açúcares foram realizadas por meio de cromatografia em papel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.4.1. Cromatografia em papel

Um microlitro do sobrenadante de cada linhagem isolada foi aplicado em papel Whatman nº 1 (40 x 22 cm), tendo-se como padrões as soluções a 10% (p/v) de sacarose, glicose, frutose e o xarope dos FOS comercial Newsugar.

A cromatografia descendente em papel foi desenvolvida por 18 horas, utilizando a mistura de acetato de etila, álcool isopropílico e água, na proporção de 5:3:2 (v:v) (adaptado de OLIVEIRA,1997). O cromatograma foi revelado com a mistura de 100 mL de acetona, 1g de difenilania, 1 mL de anilina e 10 mL de ácido fosfórico, seguido de aquecimento em estufa a 100°C (Oliveira, 1997; LUND e WYATT, 1973).

3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise quantitativa dos açúcares foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo líquido Waters 600E acoplado ao detector Refratométrico Waters 410 (IR).

Foram utilizadas duas colunas cromatográficas para análise: coluna de troca iônica Lichrospher 100 NH₂ 5µm (250x4) (Merck) e a coluna KS 801 (Waters), a qual separa compostos por tamanho molecular.

A primeira foi utilizada para analisar os oligossacarídeos 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil-nistose (GF4), tendo como solvente acetonitrila:água na proporção de 60:40 (v:v), a temperatura ambiente e fluxo de 1 mL/min.

A segunda foi utilizada para quantificar os mono e dissacarídeos, glicose, frutose e sacarose, tendo a água como fase móvel, a 75°C e fluxo de 1mL/min.

Os padrões utilizados foram glicose, frutose e sacarose da marca Sigma e 1-kestose, nistose e frutofuranosil-nistose da Meiji Seika Ltda.

3.5 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração do substrato na formação de FOS, cada linhagem selecionada, conforme o item 3.2.1, *Penicillium sp* LBJBS01, *Penicillium sp* LBJBS02, *Aureobasidium sp* LBJBS03 e *Bacillus sp* LBJBS04 foi primeiramente inoculada em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de meio de crescimento 1% sacarose, 0,2% de extrato de levedura, 0,04% de MgSO₄ e incubadas a 30°C a 200 rpm por 24 horas.

Após esse período, alíquotas de 10 mL de cada cultura foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio com diferentes concentrações de sacarose atingindo a concentração final de 20%, 40%, 60% e 70%, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia e incubadas a 30°C, 200 rpm por 72 horas.

A manipulação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e os meios de cultivos foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

Completada as 72 horas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C e filtradas em papel de filtro Whatman nº1. O sobrenadante foi analisado por cromatografia em papel, conforme o item 3.4.1 e cromatografia líquida de alta eficiência, conforme item 3.4.2.

3.6 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, FORMAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Cada linhagem selecionada, *Penicilium sp* LBJBS01, *Penicilium sp* LBJBS02, *Aureobasidium sp* LBJBS03 e *Bacillus sp* LBJBS04 foi primeiramente inoculada em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL do meio de crescimento 1% sacarose, 0,2% de extrato de levedura, 0,04% de MgSO₄ e incubadas a 30°C a 200 rpm por 24 horas.

Após este período, alíquotas de 10 mL de cada cultura foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura. Cada microrganismo foi inoculado em diferentes meios de cultivo, os quais variaram em relação ao teor de sacarose inicial. Estas concentrações foram determinadas pelos resultados obtidos no item 4.3, sendo escolhidos dois valores para concentração de sacarose inicial, os que apresentaram os dois melhores resultados de rendimento para a produção de FOS.

Cada linhagem foi inoculada em dois meios diferentes:

1. *Penicilium sp* LBJBS01 :

- Meio1: 60% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.
- Meio 2: 70% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.

2. *Penicilium sp* LBJBS02:

- Meio1: 40% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.
- Meio 2: 70% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.

3. *Aureobasidium sp* LBJBS03:

- Meio1: 40% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.
- Meio 2: 70% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.

4. *Bacillus sp* LBJBS03:

- Meio1: 20% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.
- Meio 2: 60% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia.

Incubadas a 30°C, 200 rpm por 72 horas.

A manipulação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e os meios de cultivos foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

As amostragens foram feitas em duplicata nos tempos de 24, 48 e 72 horas de fermentação para avaliar a concentração de açúcares por CLAE, conforme o item 3.4.2, pH, e atividade enzimática conforme o item 3.6.1.

3.6.1. Determinação da atividade enzimática da β -frutofuranosidase

A atividade enzimática foi determinada nos tempos de fermentação de 24, 48 e 72 horas.

As amostras das linhagens *Penicilium sp* LBJBS01 , *Penicilium sp* LBJBS02, foram filtradas em papel de filtro Whatman nº1 e das linhages *Aureobasidium sp* LBJBS03 e *Bacillus sp* LBJBS04 centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C. O filtrado e o sobrenadante foram utilizados para avaliar a atividade da enzima extracelular.

Um mililitro de cada amostra foi incubada em frascos Erlenmeyers de 50 mL, contendo 9 mL de solução de sacarose (atingindo uma concentração final de 10%) em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5, a 55°C por 30 min a 180 rpm (adaptado de OLIVEIRA, 1997).

Para analisar a glicose, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência, descrita no item 3.4.2.

Uma unidade da β -frutofuranosidase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de glicose/minuto/mL.

3.7 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO

As linhages *Penicilium sp* LBJBS01 , *Penicilium sp* LBJBS02, *Aureobasidium sp* LBJBS03 foram inoculadas em meio constituído de melaço diluído atingindo concentrações de 20, 30 e 40% de açúcares redutores totais (ART).

O melaço utilizado, originário da usina da Pedra localizada no município de Serrana, São Paulo, continha 55,68% de (ART), dentre eles, 43,88% de sacarose, 4,08% de glicose, 5,47% de frutose

A manipulação foi realizada em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e os meios de cultivo foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento ANOVA. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para caracterizar as diferenças entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SAS System.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS.

Foram testadas para produção de frutooligossacarídeos 205 linhagens, sendo elas, 67 linhagens isoladas do favo de mel, 34 linhagens isoladas de frutas do cerrado e 104 linhagens pertencentes à coleção do Laboratório de Bioaromas (FEA/UNICAMP).

Dentre as linhagens, 64 apresentaram produção de FOS, das quais 31 linhagens se destacaram visualmente, apresentando um “spot” mais forte na cromatografia em papel. Os “spots” foram identificados pela comparação entre as distâncias percorridas (Rf), sendo a frutose, a glicose e a sacarose, os açúcares que percorreram maiores distâncias e apresentaram-se acima nos cromatogramas. Os frutooligossacarídeos percorreram menores distâncias, apresentaram-se abaixo nos

cromatogramas. A figura 5 ilustra como exemplo o cromatograma de algumas das linhagens que se destacaram.

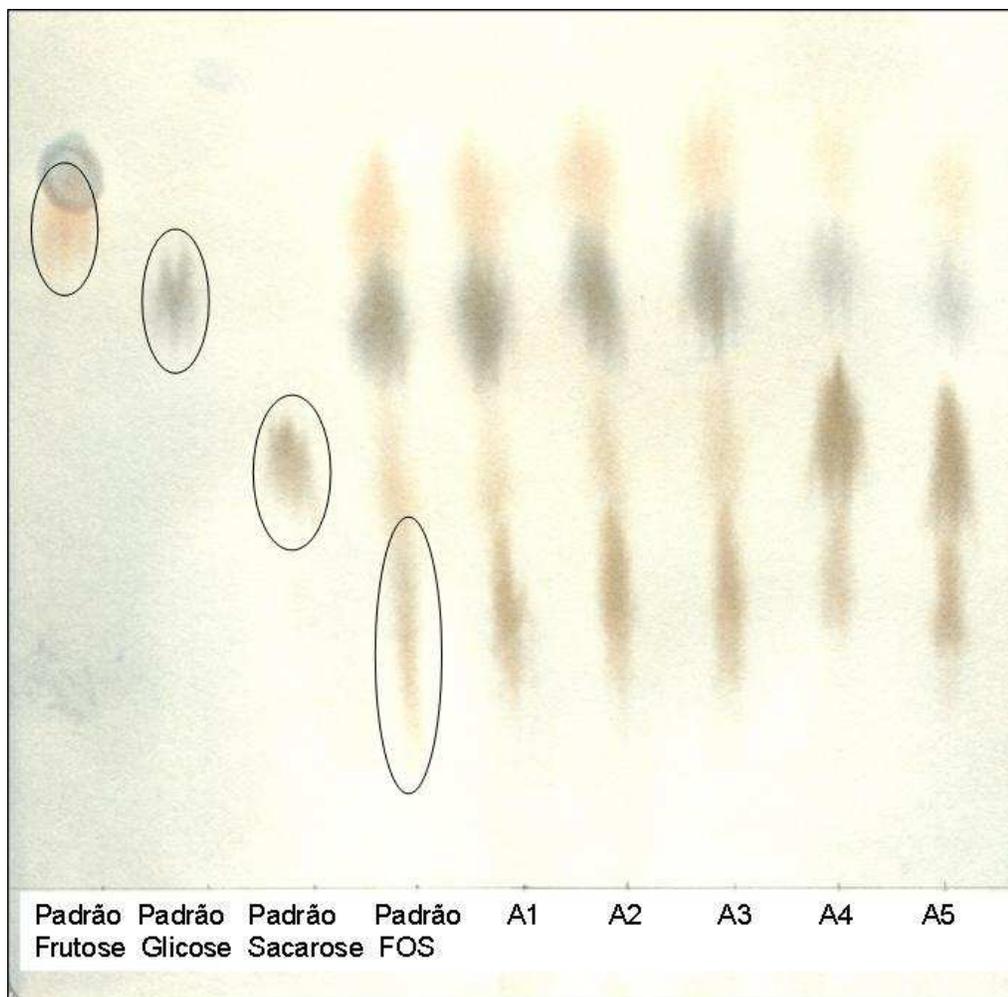


Figura 5: Cromatograma em papel utilizado para a seleção inicial de linhagens. A-amostra.

4.1.1. Seleção das melhores linhagens para produção de FOS

Dentre as 31 linhagens submetidas à nova fermentação, apenas 12 linhagens se destacaram visualmente apresentando um “spot” mais forte na altura do FOS, e então foram submetidas à análise por CLAE, conforme item 3.4.2.

A tabela 5 ilustra os resultados apresentados para produção de FOS.

Esses resultados foram estimados entre a fração frutooligossacarídeos totais e os demais carboidratos presentes no sistema de reação, pois o tipo de coluna

utilizada (KS 801) descrita no item 3.4.2, não permite separar individualmente os frutooligossacarídeos.

Tabela 5: Valores obtidos na seleção das linhagens.

| Áçúcares (%) | Linhagens | | | | | |
|------------------|-----------|----------------|----------------|---------|----------------|--------------------|
| | FM 2-3 | FM 7-1 | FM 7-2 | FM 7-3 | FM 7-4 | FM 9-1 |
| Sacarose | 34,567 | 27,595 | 0,022 | 6,296 | 0,960 | 38,177 |
| Glicose | 0,560 | 6,602 | 15,159 | 13,593 | 16,189 | 1,153 |
| Frutose | 0,000 | 0,000 | 9,197 | 7,025 | 9,219 | 0,000 |
| FOS total | 5,477 | 5,972 | 10,480 | 14,236 | 14,718 | 1,278 |
| R FOS (%) | 13,693 | 14,931 | 26,201 | 35,590 | 36,795 | 3,196 |
| Áçúcares (%) | FM 9-4 | LBJBS01 | LBJBS02 | FM 14-2 | LBJBS03 | LBJBS04 |
| Sacarose | 38,491 | 0,418 | 0,274 | 0,136 | 0,210 | 3,680 |
| Glicose | 0,466 | 10,535 | 10,393 | 9,353 | 11,272 | 18,750 |
| Frutose | 0,000 | 1,023 | 0,847 | 0,000 | 0,422 | 3,345 |
| FOS total | 1,424 | 30,038 | 30,038 | 14,131 | 29,026 | 1046510,134 |
| R FOS (%) | 3,561 | 75,096 | 75,096 | 35,326 | 72,566 | Área |

R - Rendimento

As maiores produções de frutooligossacarídeos a partir da sacarose, dentre as 12 linhagens selecionadas foram às linhagens de número LBJBS01, LBJBS02, LBJBS03 e LBJBS04. As linhagens LBJBS01 e LBJBS02 e LBJBS03 foram escolhidas por se destacarem na produção de FOS em relação às outras. Já a linhagem LBJBS04 foi escolhida por produzir um composto diferente das outras linhagens, o qual se sugere ser um frutooligossacarídeo de maior grau de polimerização (PD), pois a coluna cromatográfica KS801 separa os compostos por tamanho molecular, sendo os maiores compostos eluídos primeiramente, por interagirem menos com a coluna. Este composto será denominado composto X neste trabalho. Contudo para verificar a identidade do composto é necessário realizar análises de espectrometria de massas. A figura 6 apresenta os cromatogramas das quatro linhagens selecionadas a modo de comparação.

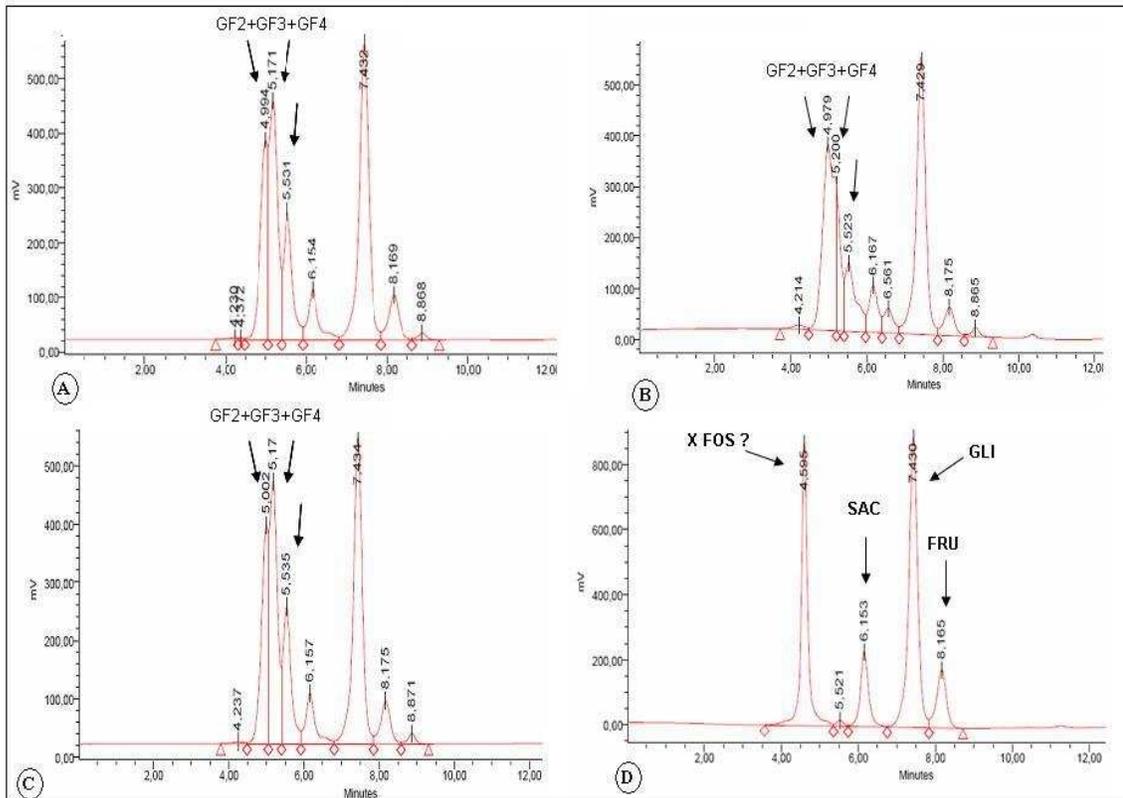


Figura 6: Cromatograma das linhagens selecionadas: A- LBJBS01, B- LBJBS02, C- LBJBS03, d LBJBS04.

4.2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS

Após as análises de qualidade das seqüências de DNA, estas foram submetidas aos bancos de dados do GenBank e do RDP II e verificou-se a porcentagem de similaridade com outras seqüências do banco.

Fungo 01 – Linhagem LBJBS01

Organismo com maior identidade: *Penicillium* sp.

Similaridade da seqüência: 375/401 (93%)

```
TCTGAGTAACATGCTACTACCGACTTCAGGAAGGGGTGTATTTATTAGAT
AAAAAACCAACGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGAATCATAATAACTTAACG
AATCGCATGGTCTTGCGCCGGCGATGGTCATTCAATTTTGCCTATAACT
TCGATGGAGGATAGTGCCTACATGGGCCAACGGGAACGGGGAATATGGGT
```

TCGATCCGGAGAGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACACTCCAAGGAGGCA
GCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTCGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAA
TACTGATACGGGGTTCTTTGGGGTCTCGTAAGTGGAATGAGAACAATTTA
AATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCCCCCCCAAC

Fungo 02 – Linhagem LBJBS02

Organismo com maior identidade: *Penicillium* sp.

Similaridade da seqüência: 367/387 (94%)

GTCATTCCGGACGATATCCCATAGATGTTTTACTCCTCCCGAGCGGGATTG
GTATTTTCGCGCCTGCTCCTTCCTTGGATGTGGGAGCCGTTTCTCAGGCTC
CCTCTCCGGAATCGAACCTAATTCTCCGTTACCCGTTGCCACCATGGTA
GGCCACTATCCTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAACC
ATCGCCGGCGCAAGGCCATGCGATTGTTAAGTTATTATGATTCACCAAG
GAGCCCCGAAGGGCGTTGGTTTTTTATCTAAAATACACCCCTTCCTGAA
GTCGGGGTTTGTAGCATGTATTAGCTCTAGAATTCCACAGGTATCATGTA
GTAAGGACTATCAAAAACGAAACTGATTTATGGCCATTCGCGTTCACAG

Fungo 03 (levedura) – Linhagem LBJBS03

Organismo com maior identidade: *Aureobasidium pullulans*

Similaridade da seqüência: 367/401 (91%)

TCGCGATCGGGAAC TTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGTATGTGGACGCC
GGTTTCTCAGGCTCCCTCTGCGGAATAGAACCCTATATTCTCGTTACCCG
TTGATACCATGGTAGGCCACTATCCTACCATCGAACGTTGATCGGGCAGA
AATTTGAATGAACCATCGCCGGCGCAAGAGCATGCGATTGTTTTAGTTAT
TATGAATCACCGCGGAGCCTCGAAGGGCGTTGGTTTTTTATCTAATAATA
CACACCTATCGAAGATGGGGTTTTTAGCATGTATTAGCTCTAGAATTACC
ACGGATATCGCAGTAGTAAGGTACTATCAAATAAACGATAACTGAGTTAA
TGAAGCCATTCGCAGTTTCATCGATATAAGTTGCATAATACTTAT

Bactéria 1 - Linhagem LBJBS04

Organismo com maior identidade: *Bacillus* sp.

Similaridade da seqüência: 318/328 (96%)

```
CACGAGGAAGTGGGCGCTGACGACAATGCATTTACGCCCTAGTTCCAGG
GCTACACACGTGCTACTATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAAACCGCGAGG
TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGATCGGTATGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCGCGGAAGG
TGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTCACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG
TGCGGCTGGATACCTTTCCTTAAAAAAA
```

A análise pelo banco de dados de RDP II, utilizando um limite de confiança de 90%, confirmou que a amostra bactéria 1 pertence ao gênero *Bacillus*.

A análise de similaridade entre as duas amostras identificadas como *Penicillium* foi de 90%. Este resultado sugere que estes isolados podem ser da mesma espécie, mas de linhagens diferentes, ou pertencer a espécies diferentes.

4.3. ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

O estudo da concentração de sacarose sobre a produção de frutooligossacarídeos foi realizado de acordo com o item 3.5. Os resultados estão apresentados na tabela 6 abaixo e ilustrados na figura 7, que apresenta o rendimento da produção dos frutooligossacarídeos para cada linhagem em função da concentração do substrato (sacarose).

Tabela 6: Produção de FOS em diferentes concentrações de sacarose.

| LBJBS01 | 20% Sac | 40% Sac | 60% Sac | 70% Sac |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Sac (%) | 0,04 | 0,79 | 5,25 | 15,17 |
| Glic (%) | 8,47 | 14,26 | 21,29 | 14,56 |
| Frut (%) | 2,16 | 1,11 | 0,00 | 0,00 |
| GF2 (%) | 1,22 | 3,12 | 12,94 | 22,55 |
| GF3 (%) | 1,75 | 5,51 | 13,96 | 17,54 |
| GF4 (%) | 2,45 | 5,92 | 1,87 | 0,84 |
| Total FOS (%) | 5,42 | 14,55 | 28,77 | 40,93 |
| R FOS (%) | 29,82 | 40,01 | 52,74 | 64,32 |

| LBJBS02 | 20% Sac | 40% Sac | 60% Sac | 70% Sac |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Sac (%) | 0,63 | 1,49 | 0,00 | 20,55 |
| Glic (%) | 8,99 | 7,79 | 17,02 | 12,75 |
| Frut (%) | 1,57 | 1,37 | 0,00 | 0,00 |
| GF2 (%) | 0,00 | 12,68 | 0,00 | 24,73 |
| GF3 (%) | 0,00 | 16,18 | 1,13 | 12,51 |
| GF4 (%) | 0,27 | 2,53 | 3,80 | 0,00 |
| Total FOS (%) | 0,27 | 31,39 | 4,92 | 37,23 |
| R FOS (%) | 1,49 | 86,33 | 9,03 | 58,51 |

| LBJBS03 | 20% Sac | 40% Sac | 60% Sac | 70% Sac |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Sac (%) | 0,00 | 2,21 | 3,20 | 2,55 |
| Glic (%) | 8,63 | 20,00 | 28,82 | 22,77 |
| Frut (%) | 2,02 | 1,23 | 0,00 | 0,00 |
| GF2 (%) | 0,00 | 1,41 | 3,25 | 4,73 |
| GF3 (%) | 0,00 | 2,45 | 8,05 | 12,56 |
| GF4 (%) | 0,03 | 4,62 | 11,35 | 12,46 |
| Total FOS (%) | 0,03 | 8,48 | 22,65 | 29,75 |
| R FOS (%) | 0,17 | 23,33 | 41,53 | 46,75 |

| LBJBS04 | 20% Sac | 40% Sac | 60% Sac | 70% Sac |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Sac (%) | 0,41 | 0,00 | 22,58 | 63,84 |
| Glic (%) | 11,24 | 10,63 | 24,19 | 6,72 |
| Frut (%) | 2,24 | 2,89 | 4,12 | 0,94 |
| X (Área) | 64852,485 | 54174,66 | 132419,08 | 24776,075 |

R – Rendimento da produção de FOS total.

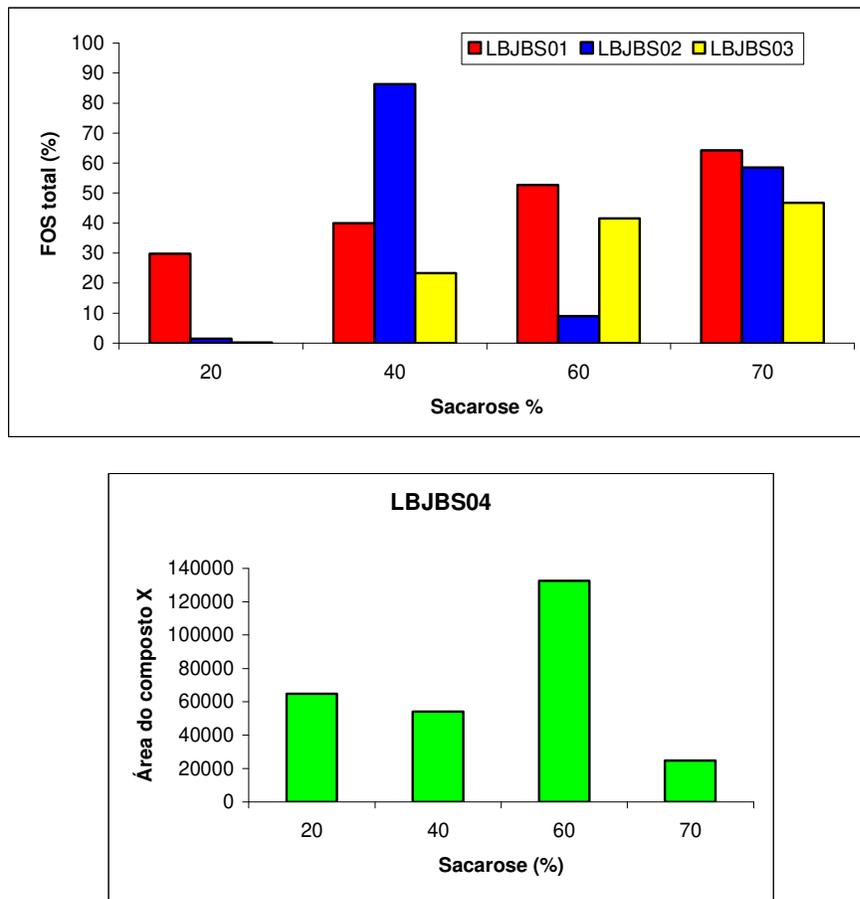


Figura 7: Produção de FOS em diferentes concentrações de sacarose.

Para o isolado *Penicillium sp* LBJBS01 verifica-se que houve um aumento na produção de FOS com o aumento da concentração de sacarose no meio, atingindo um rendimento de 64,32% em relação ao teor inicial de sacarose 70 %. Após as 72 horas de fermentação, a concentração de sacarose no meio era de 15,17% e 14,56% para glicose, sendo a frutose completamente extinta. Dentre os frutooligossacarídeos formados, 35,4%, 27,6% e 1,3% eram 1-Kestose (GF2), Nistose (GF3) e Frutofuranosil-nistose (GF4), respectivamente.

Já para o isolado *Penicillium sp* LBJBS02 a maior produção ocorreu em meio com 40% de sacarose, atingindo um rendimento de 86%. Dentre eles, 34,9%, 44,5% e 7% eram 1-Kestose (GF2), Nistose (GF3) e Frutofuranosil-nistose (GF4).

Podemos observar que ambas as linhagens produziram muito pouco GF4.

Estes resultados serão comprovados no estudo de fermentação detalhado conforme o item 4.4.

Para o isolado *Aureobasidium pullulans* LBJBS03, a produção de frutooligossacarídeos aumentou em função do aumento da concentração de sacarose inicial no meio, atingindo concentrações totais de 41,5% e 46,8% de frutooligossacarídeos no final da fermentação para os meios com concentrações iniciais de sacarose 60% e 70%.

Neste caso, nota-se que o GF2 está em menores concentrações em comparação aos teores de GF3 e GF4. Estudos cinéticos apresentados no item 4.4, explicam a formação desses açúcares.

Para o estudo do item 3.6. foram escolhidos o meio de 70% de sacarose, por apresentar um maior rendimento e o meio de 40% de sacarose, pois com essa concentração de açúcar ainda foi possível utilizar a centrifugação para separar as células após a fermentação. Nos meios constituídos de 60 e 70% de sacarose, isso não foi possível devido às altas concentrações de açúcares no meio.

A bactéria *Bacillus sp* LBJBS04, não apresentou relação de produção do composto X com a concentração de sacarose na faixa estudada, atingindo maiores produções nos meios contendo 60% e 20% de sacarose iniciais.

Segundo Yun (1996) são utilizadas altas concentrações de sacarose (acima de 700 g/L) como substrato para produção de FOS por catálise enzimática, tanto para o processo em batelada, como para o processo contínuo com células imobilizadas.

4.4 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, FORMAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS, ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O estudo foi realizado de acordo com o item 3.6 e os resultados estão descritos a seguir para cada linhagem.

As comparações estatísticas foram realizadas entre os tratamentos e o tempo de fermentação.

4.4.1. *Penicillium sp* LBJBS01

Os resultados do consumo de sacarose e produção de FOS estão apresentados na Tabela 7, abaixo:

Tabela 7: Variação nos teores de açúcares durante a fermentação da linhagem *Penicillium sp.* LBJBS01.

| <i>Penicillium sp.</i> LBJBS01 | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|--------|-------|------------------|-------|--------|--------|
| Meio 1: 60% Sac | Horas | | | Meio 2: 70% Sac | Horas | | |
| Açúcares (%) | 24 | 48 | 72 | Açúcares (%) | 24 | 48 | 72 |
| Sacarose | 48,00 | 4,28 | 3,46 | Sacarose | 38,72 | 13,24 | 5,99 |
| Glicose | 8,61 | 12,83 | 13,06 | Glicose | 3,53 | 10,75 | 14,31 |
| Frutose | 0,00 | 2,46 | 2,30 | Frutose | 1,41 | 3,25 | 3,51 |
| GF2 | 3,85 | 25,72 | 6,76 | GF2 | 1,48 | 13,67 | 31,17 |
| GF3 | 0,00 | 12,19 | 14,04 | GF3 | 0,00 | 0,00 | 6,52 |
| GF4 | 0,00 | 0,57 | 8,19 | GF4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Total FOS | 3,85 | 38,48 | 28,99 | Total FOS | 1,48 | 13,67 | 37,68 |
| R FOS (%) | 6,41A | 64,13B | 48,3C | R FOS (%) | 2,11a | 19,53b | 53,83c |

R- Rendimento da produção de FOS total.

Pode-se notar que o rendimento atingido no meio com 70% de sacarose (meio 2) foi maior que no meio com 60% de sacarose (meio 1), comprovando o resultado apresentado no item 4.3, com os valores de 48,31% e 53,83% no final das 72 horas de fermentação. Contudo, o estudo mostrou que a partir das 48 horas de fermentação no meio 1, o microrganismo começou a produzir GF4, diminuindo os teores de GF2, o que causou a diminuição dos teores de frutooligossacarídeos totais. A figura 8, apresenta a cinética de produção de FOS e os teores de cada frutooligossacarídeo formados durante a fermentação no meio 1, e a figura 9 no meio 2. A Figura 10 representa o rendimento da produção de FOS em cada um dos meios. É importante ressaltar que no meio 2, a maioria dos frutooligossacarídeos produzidos foram GF2, muito pouco GF3 e nenhum GF4.

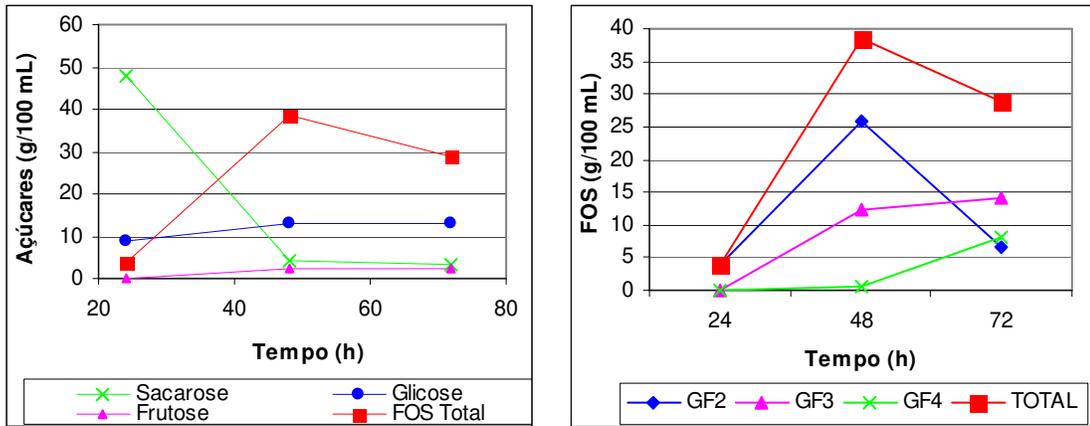


Figura 8: Produção de frutooligossacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS01 durante o período de fermentação no meio com 60% de sacarose.

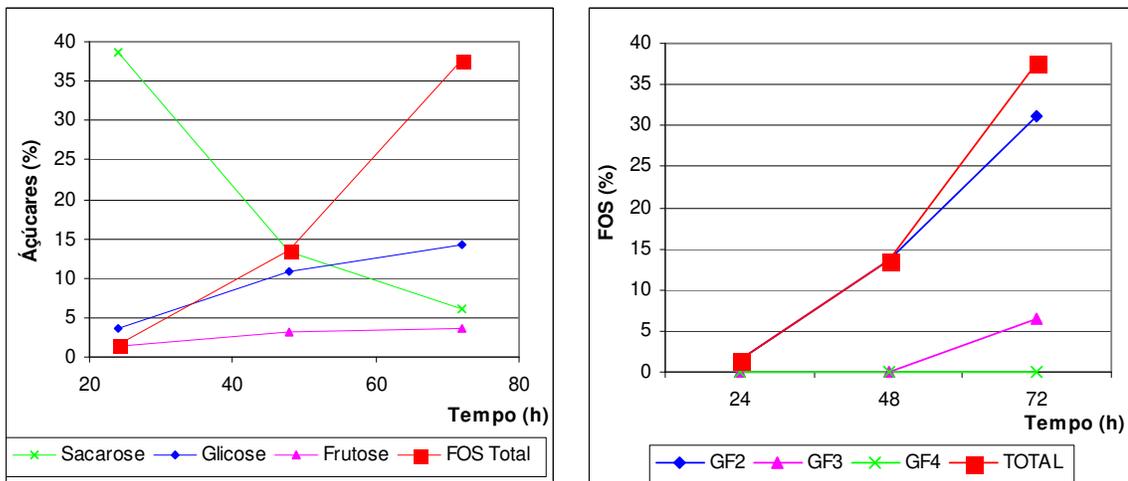


Figura 9: Produção de frutooligossacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS01 durante o período de fermentação no meio com 70% de sacarose.

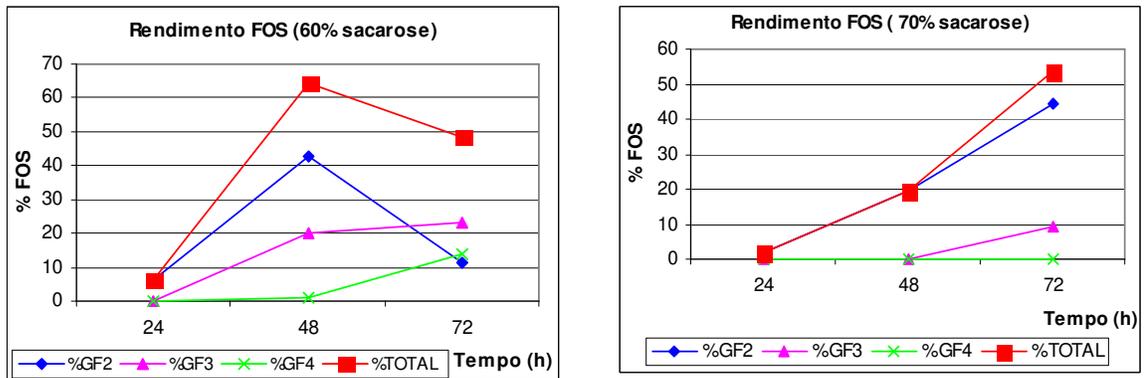


Figura 10: Rendimento da produção de frutooligossacarídeos pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS01 durante o período de fermentação nos meios com 60 e 70% de sacarose.

A tabela 8 mostra os valores de pH e atividade enzimática da β -frutofuranosidase em função do tempo de fermentação.

Tabela 8: Variação de pH e atividade enzimática durante a fermentação do fungo *Penicillium sp.* LBJBS01

| <i>Penicillium sp.</i> LBJBS01 | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|
| Meio 1: 60% | 24h | 48h | 72h | Meio 2: 70% | 24h | 48h | 72h |
| TOTAL FOS (%) | 3,85 | 38,48 | 28,99 | TOTAL FOS (%) | 1,48 | 13,67 | 37,68 |
| pH | 7,05A | 5,55B | 4,79C | pH | 6,70a | 6,05b | 5,27c |
| Ativ. Enz. (U/mL) | | | | Ativ. Enz. (U/mL) | 0,51A | 0,35B | 2,59C |

As maiores produções de FOS ocorreram com pH em torno de 5,5 em ambos os meios. As variações do pH no meio durante a fermentação foram de 7,05 a 4,79 no meio1 e 6,7 a 5,3 no meio 2.

Na interpolação de dados de produção de FOS com atividade enzimática mostrou que a maior produção de FOS ocorreu quando constatou maior atividade enzimática.

4.4.2. *Penicillium sp* LBJBS02

Os resultados da produção de FOS e consumo da sacarose durante a fermentação estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Variação nos teores dos açúcares durante a fermentação da linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02.

| <i>Penicillium sp.</i> LBJBS02 | | | | | | | |
|--------------------------------|--------|--------|--------|------------------|-------|---------|---------|
| Meio 1: 40% | Horas | | | Meio 2: 70% | Horas | | |
| Açúcares (%) | 24 | 48 | 72 | Açúcares (%) | 24 | 48 | 72 |
| Sacarose | 4,19 | 2,65 | 2,77 | Sacarose | 35,21 | 3,79 | 5,59 |
| Glicose | 10,66 | 9,67 | 11,53 | Glicose | 0,00 | 19,42 | 17,56 |
| Frutose | 1,48 | 2,47 | 3,06 | Frutose | 0,00 | 1,23 | 3,63 |
| GF2 | 15,103 | 5,299 | 6,757 | GF2 | 1,12 | 11,13 | 26,52 |
| GF3 | 0,946 | 10,673 | 14,031 | GF3 | 0,00 | 19,86 | 15,47 |
| GF4 | 0 | 5,168 | 8,196 | GF4 | 0,00 | 9,13 | 1,36 |
| Total FOS | 16,05 | 21,14 | 28,98 | Total FOS | 1,12 | 40,12 | 43,35 |
| R FOS (%) | 40,12A | 52,85A | 72,46B | R FOS (%) | 1,60a | 57,32Ab | 61,93Bb |

R- Rendimento da produção de FOS total.

O rendimento atingido no meio com 40% de sacarose (meio1) foi maior que no meio com 70% de sacarose (meio 2), comprovando o resultado apresentado no item 4.3, com os valores de 72,46% e 61,93%, respectivamente no final das 72 horas de fermentação. Diferentemente da linhagem LBJBS01, o microrganismo manteve crescente a produção de FOS, contudo no meio 1, ocorreu um consumo de GF2 após as 24 horas de fermentação para a produção dos outros oligossacarídeos, já no meio 2, a produção de GF2 se manteve crescente.

As figuras 11 e 12 representam a cinética de produção dos FOS e o consumo de sacarose nos diferentes meios, e a figura 13 o rendimento da produção.

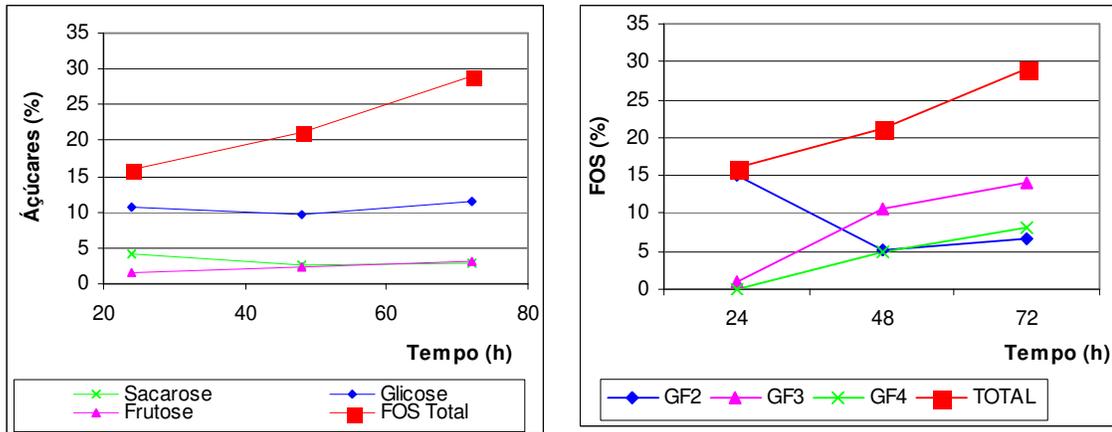


Figura 11: Produção de frutooligosacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02 durante o período de fermentação no meio com 40% de sacarose.

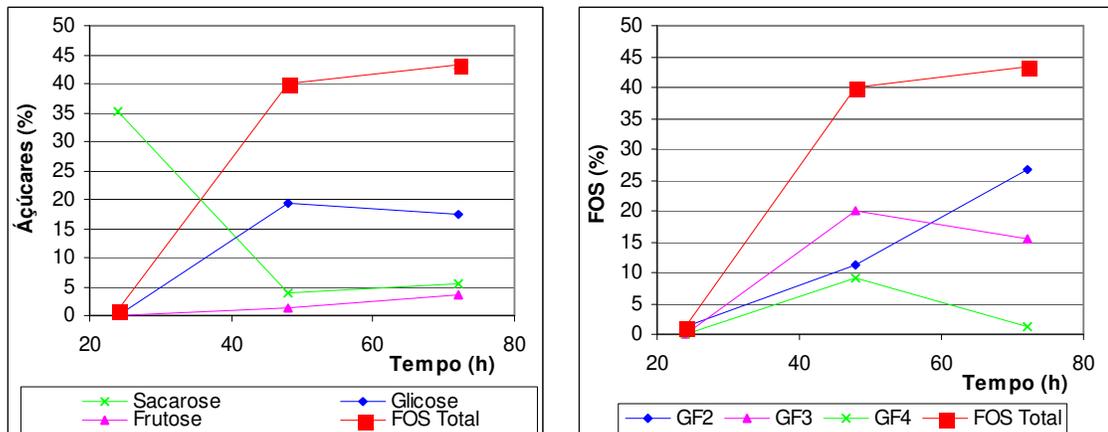


Figura 12: Produção de frutooligosacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02 durante o período de fermentação no meio com 70% de sacarose.

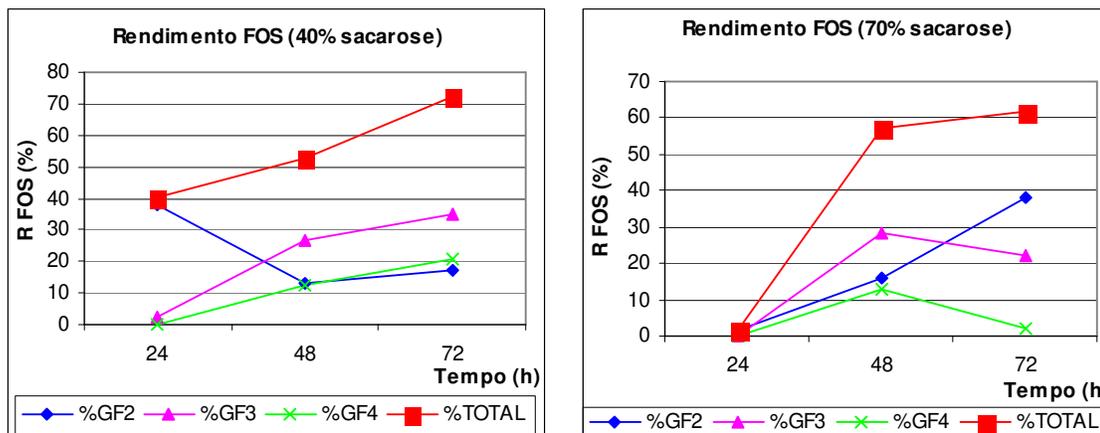


Figura 13: Rendimento da produção de frutooligossacarídeos pela linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02 durante o período de fermentação nos meios com 60 e 70% de sacarose.

A tabela 10 mostra os valores de pH e atividade enzimática em função do tempo de fermentação, sendo ilustrados na figura 14 (em anexo).

Tabela 10: Variação de pH e atividade enzimática durante a fermentação da linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02

| <i>Penicillium sp.</i> LBJBS02 | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------------------------|--------|--------|--------|
| Meio 1: 40% | 24h | 48h | 72h | Meio 2: 70% | 24h | 48h | 72h |
| TOTAL FOS (%) | 16,05 | 15,97 | 28,98 | TOTAL FOS (%) | 1,12 | 40,12 | 43,35 |
| pH | 5,91A | 4,86B | 4,75B | pH | 6,60Aa | 5,90ab | 5,02Bb |
| Ativ. Enz. (U/mL) | 1,65A | 2,71B | 2,29C | Ativ. Enz.(U/mL) | 0,46a | 5,55b | 3,21c |

As maiores produções de FOS ocorreram com pH em torno de 4,75 e 5,02 para o meio 1 e 2, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre eles. As variações do pH no meio durante a fermentação foram de 5,91 a 4,75 no meio1 e 6,6 a 5,02 no meio2.

Na interpolação de dados de produção de FOS com atividade enzimática mostrou que as maiores produções de FOS ocorreram quando se constatarem maiores atividades enzimáticas, a partir das 48 horas de fermentação.

Hayashi et al.(2000) utilizou células de *Penicillium citrinum* como fonte de enzima intracelular para produção de FOS, atingindo um rendimento de 55%. Dentre os frutooligossacrídeos formados estão 1- kestose, nistose e neokestose.

Já Barthomeuf e Pourrat (1995) atingiram a produção de 80%, otimizada com enzimas de *Penicillium rugulosum*, produzindo principalmente nistose e frutofuranosil nistose.

Ambas as linhagens de *Penicillium sp* utilizadas nesse estudo obtiveram ótima produtividade, sendo que a linhagem LBJBS02 se destacou por utilizar menor concentração de substrato e atingir o maior rendimento.

4.4.3. *Aureobasidium pullulans* LBJBS03

Os resultados da produção de FOS e consumo da sacarose durante a fermentação estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Variação nos teores dos açúcares durante a fermentação da linhagem *Aureobasidium pullulans* LBJBS03.

| <i>Aureobasidium pullulans</i> LBJBS03 | | | | | | | |
|----------------------------------------|--------------|--------|-------|------------------|--------|--------------|--------|
| Meio 1: 40% | Horas | | | Meio 2: 70% | Horas | | |
| | Açúcares (%) | 24 | 48 | | 72 | Açúcares (%) | 24 |
| Sacarose | 1,15 | 1,13 | 1,16 | Sacarose | 2,50 | 3,82 | 3,94 |
| Glicose | 11,97 | 12,97 | 5,72 | Glicose | 14,80 | 20,08 | 18,56 |
| Frutose | 1,00 | 1,47 | 1,60 | Frutose | 0,99 | 2,31 | 3,82 |
| GF2 | 2,31 | 1,40 | 1,40 | GF2 | 20,03 | 5,74 | 5,04 |
| GF3 | 4,59 | 1,07 | 0,42 | GF3 | 18,44 | 11,18 | 9,59 |
| GF4 | 5,82 | 2,20 | 0,96 | GF4 | 3,58 | 4,08 | 10,09 |
| Total FOS | 12,72 | 4,67 | 2,78 | Total FOS | 42,05 | 21,00 | 24,72 |
| R FOS (%) | 31,80A | 11,68B | 6,96C | R FOS (%) | 60,07a | 30,00b | 35,31c |

R- Rendimento da produção de FOS total.

O rendimento atingido no meio com 70% de sacarose (meio 2) foi maior que no meio com 40% de sacarose (meio1), com os valores de 60,07% e 31,80% em 24 horas de fermentação. Após este período os teores de frutooligossacarídeos totais decaíram, devido um possível consumo dos mesmos. O único frutooligossacarídeo

que se manteve crescente em função do tempo de fermentação foi o GF4. Isto foi observado somente no meio2.

As figuras 14 e 15 representam a cinética de produção dos FOS e o consumo de sacarose nos diferentes meios, e a figura 16 o rendimento da produção.

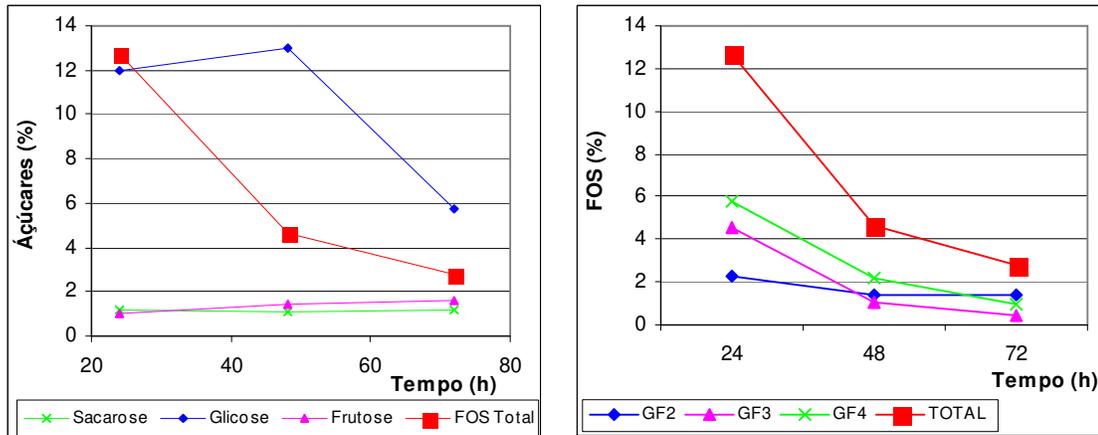


Figura 14: Produção de frutooligossacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Aureobasidium pullulans*. LBJBS03 durante o período de fermentação no meio com 40% de sacarose.

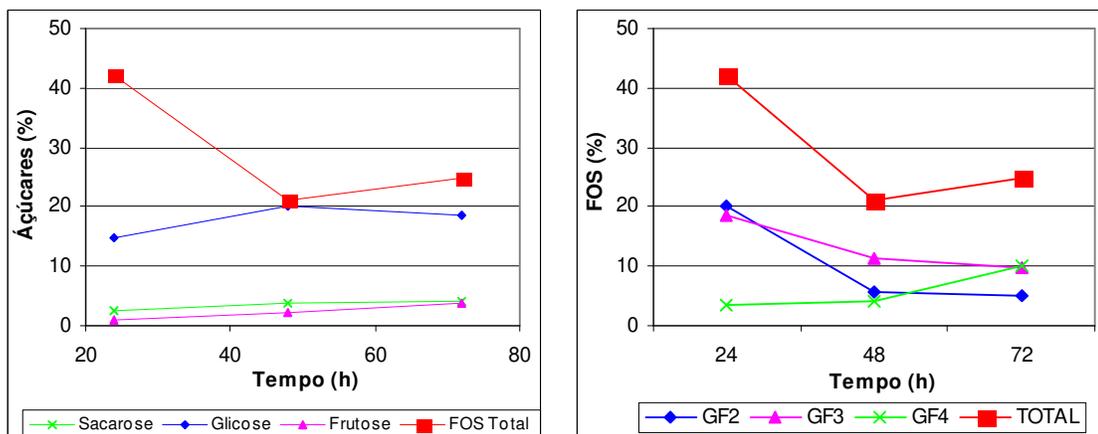


Figura 15: Produção de frutooligossacarídeos e consumo de sacarose pela linhagem *Aureobasidium pullulans*. LBJBS03 durante o período de fermentação no meio com 70% de sacarose.

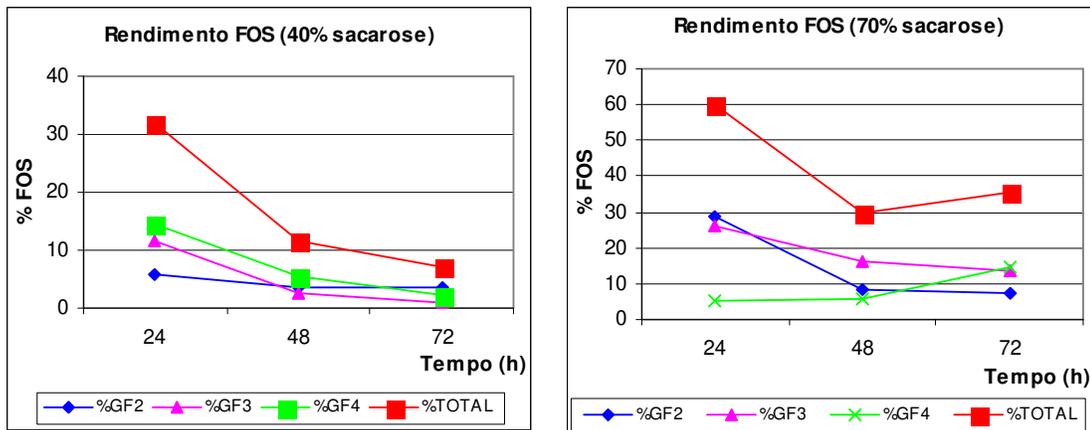


Figura 16: Rendimento da produção de frutooligossacarídeos pela linhagem *Aureobasidium pullulans*. LBJBS03 durante o período de fermentação nos meios com 60 e 70% de sacarose.

A tabela 12 mostra os valores de pH e atividade enzimática em função do tempo de fermentação, sendo ilustrados na figura 17.

Tabela 12: Variação de pH e atividade enzimática durante a fermentação da linhagem *Aureobasidium pullulans* LBJBS03.

| <i>Aureobasidium pullulans</i> LBJBS03 | | | | | | | |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|-------------------------|--------|--------|--------|
| Meio 1: 40% | 24h | 48h | 72h | Meio 2: 70% | 24 | 48 | 72 |
| TOTAL FOS (%) | 12,72 | 4,67 | 2,78 | TOTAL FOS (%) | 42,05 | 10,50 | 24,72 |
| pH | 5,80A | 4,67A | 4,36B | pH | 5,48Aa | 5,45Aa | 5,66a |
| Ativ. Enz. (U/mL) | 3,95A | | 3,90A | Ativ. Enz.(U/mL) | 2,99Aa | 3,63a | 5,11Aa |

As variações do pH no meio durante a fermentação foram de 5,80 a 4,36 no meio1 e 5,48 a 5,66 no meio2, não apresentando diferenças significativas durante a fermentação e produção de FOS. Os valores de atividade enzimática se mantiveram constantes nos tempos de 24 e 72 horas de fermentação no meio 1 e no meio 2, a atividade enzimática aumentou com o tempo de fermentação, contudo não apresentou diferenças significativas.

Este microrganismo é muito usado para produção de FOS industrial e em estudos. Dados na literatura relatam que a produção de FOS, utilizando a enzima deste fungo aumenta com o aumento da concentração de substrato (HIDAKA et al.,

1988; HIRAYAMA et al., 1989; HAYASHI et al., 1993; CHANG et al., 1994; Oliveira, 1997). Sendo assim, mesmo sendo utilizada a fermentação, este mecanismo foi notado, constatando que a concentração de sacarose no meio pode estimular a atividade da frutofuranosidase durante o processo fermentativo.

Os frutooligossacarídeos produzidos estão de acordo com a literatura (Yun,1999). Dentre as linhagens estudadas, este microrganismo foi o que maior produziu frutofuranosiltransferase, destacando a atividade enzimática mensurada e o que converteu a sacarose em frutooligossacarídeos em menor tempo de fermentação.

4.4.4. *Bacillus sp.* LBJBS04

Os resultados da produção do composto X, consumo de sacarose e variação do pH durante a fermentação estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Variação nos teores de açúcares, de pH e atividade enzimática durante a fermentação da linhagem *Bacillus sp.* LBJBS04.

| Bacillus sp. LBJBS04 | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| Meio 1: 20% | 24 | 48 | 72 | Meio 2: 60% | 24 | 48 | 72 |
| SAC | 1,97 | 1,910 | 1,345 | SAC | 54,829 | 49,931 | 41,952 |
| GLI | 9,955 | 8,929 | 8,847 | GLI | 1,963 | 1,633 | 0,000 |
| FR | 3,338 | 2,888 | 2,700 | FR | 1,822 | 1,396 | 0,000 |
| sub total | 15,26 | 13,73 | 12,89 | sub total | 58,61 | 52,96 | 41,95 |
| ÁREA de X | 25956,09 | 56186,83 | 61078,71 | ÁREA de X | | | |
| pH | 6,77A | 7,25B | 7,07C | pH | 7,37a | 7,56b | 7,1c |

Apenas no meio 1, contendo 20% de sacarose o composto X foi produzido. No meio 2 não houve produção e quase não houve atividade hidrolítica da enzima, já que a produção de glicose no meio foi muito baixa.

A figura 17 apresenta a produção do composto X com relação ao tempo de fermentação.

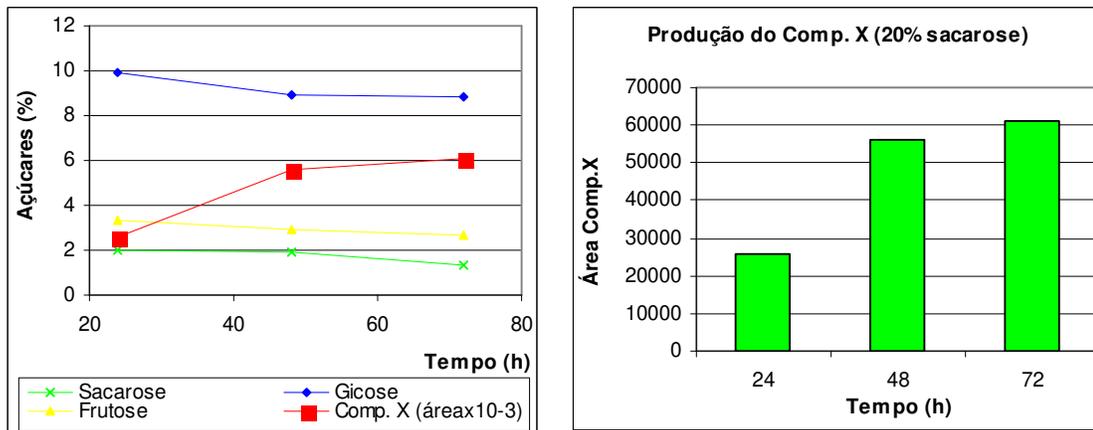


Figura 17: Produção do composto X e consumo de sacarose pela linhagem *Bacillus* sp. LBJBS04 durante o período de fermentação no meio com 20% de sacarose.

As variações do pH no meio durante a fermentação foram de 6,77 a 7,07 no meio 1 e 7,37 a 7,10 no meio 2.

Há uma grande possibilidade do composto X ser um frutooligossacarídeo de maior grau de polimerização ou ser um NEOFOS.

Park, Oh e Yun (2001), pesquisaram a produção de FOS por *Bacillus macerans* EG-6 utilizando a enzima de forma purificada e não purificada do microrganismo e perceberam que há a produção de GF5 e GF6 (FOS de maior DP) quando utilizam a enzima bruta. Quando purificada, produziu somente GF2, GF3 e GF4.

Euzenat, Guilbert e Combes (1996) estudaram a enzima extracelular *Bacillus subtilis* para produção de frutooligossacarídeos e frutanas, comprovando a formação de moléculas com ligações do tipo 6^G pela bactéria.

4.5 PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS PELA FERMENTAÇÃO DE MELAÇO

A fermentação foi realizada de acordo com o item 3.7.

As linhagens apresentaram maiores rendimentos na fermentação com melaço diluído a 40% de ART, contendo 31,52% de sacarose, 2,93% de glicose e 3,9% de frutose. Os valores obtidos para os rendimentos foram de 46,5%, 40,8% e 28,7%

para as linhagens *Penicillium sp.* LBJBS01, *Aureobasidium pullulans* LBJBS03 e *Penicillium sp* LBJBS02, respectivamente.

A figura 18 ilustra esses resultados.

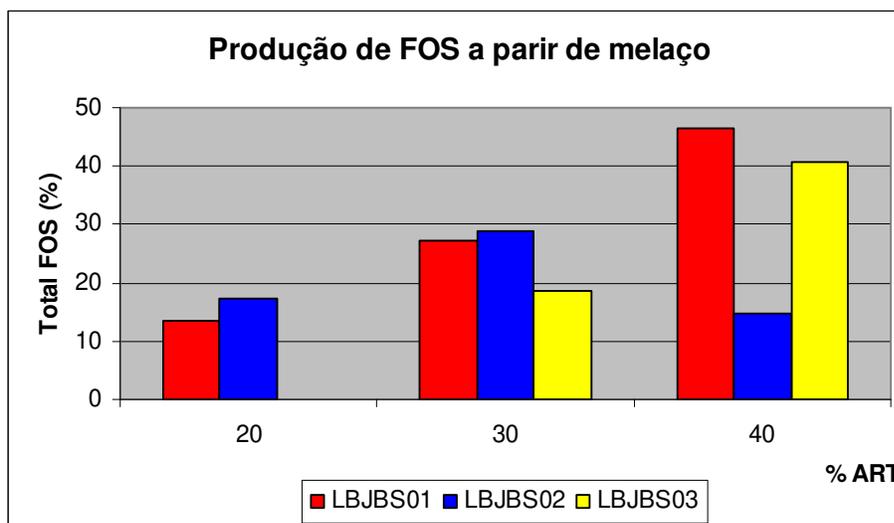


Figura 18: Produção de frutooligossacarídeos a partir de melão.

Shin et al. (2004), utilizando *Aureobasidium pullulans* como fonte intracelular da enzima, atingiu uma produção de 166 g/L de FOS a partir de melão com teor inicial de 360 g/L de sacarose, que representa um rendimento de 46% de FOS, em relação ao teor inicial de sacarose.

Comparativamente com o estudo acima, os rendimentos atingidos foram similares para as linhagens de *Penicillium sp* LBJBS01 e *Aureobasidium pullulans* LBJBS03.

5. CONCLUSÕES

Dentre as 205 linhagens avaliadas para a produção de FOS na seleção inicial, as linhagens osmofílicas, isoladas de favo de mel, se destacaram.

As linhagens selecionadas, *Penicillium sp* LBJBS01, *Penicillium sp* LBJBS02, *Aureobasidium pullulans* LBJBS 03, se apresentaram altamente produtivas utilizando processo de fermentação submersa para produção de frutooligossacarídeos. Atingiu valores de rendimento para a produção de FOS acima de 50%, assemelhando-se aos rendimentos alcançados nos atuais processos industriais.

A linhagem *Aureobasidium pullulans* LBJBS03 se destacou dentre as outras por apresentar alta produtividade, alto rendimento em menor tempo de fermentação, além de ser um microrganismo de fácil manipulação. Os valores atingidos para o rendimento foram de 60,07% e 40,8% em meios contendo sacarose e melaço como substrato, respectivamente, em apenas 24 horas de fermentação.

A linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02 se destacou por apresentar um rendimento de 70%, superior ao das outras linhagens selecionadas, utilizando menores teores iniciais de sacarose.

A linhagem bacteriana *Bacillus sp.* LBJBS04 distinguiu-se das demais por produzir um composto de conformação molecular diferente dos demais frutooligossacarídeos produzidos pelos outros isoaldos, sendo esses sugerido ser um outro tipo de FOS.

O fato de se utilizar a fermentação submersa para a produção de frutooligossacarídeos apresenta inúmeras vantagens frente aos processos mais utilizados na produção, como a obtenção do produto de maneira direta, eliminando a fase de produção, extração e purificação da enzima, diminuindo assim, custos na produção. Também por apresentar maior produtividade, ser mais rápido e atingir altos rendimentos.

Nesse sistema, o melaço pode ser utilizado como substrato alternativo de baixo custo, apresentando rendimentos satisfatórios. Este, por ser um subproduto da indústria sucro-alcooleira poderia ser aproveitado para obter um produto de alto valor agregado, como o frutooligossacarídeos.

REFERÊNCIAS

A.F.T., S. et al. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, n.2, p.323-328, 18 dez.2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 5 mai. 2008.

ÁLVARO-BENITO, M. et al. Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **Journal Of Biotechnology**, Valencia, p. 75-81. 15 out. 2007.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P.. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. , p.331-338, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO – ABIA. Disponível em: < http://www.anuarioabia.com.br/editorial_05.htm > Acesso em : 26 jun.2008.

ATYED, H.; DUVNJAK, Z.. Study of the production of fructose and ethanol from sucrose media by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 57, p.407-411, 2001.

BARTHOMEUF,C., POURRAT, H. Production of high-content fructo-oligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p.57-64, set. 1995.

BEKERS, M. et al. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p.701-706, 2002.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia: Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgrad Blucher, 1986. 300 p.

BRUZZESE, E. et al. Impact of prebiotics on human health. **Digestive And Liver Disease**, v. 38, S.2, n. 38, p.S283-S287, 2006.

BYUN, S. H. et al. Production of fructo-oligosaccharides from sucrose by two levansucrases from *Pseudomonas aurantiaca* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v.131, n.2, p.S112, set. 2007.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M., **Alimentos para Fins Especiais:Dietéticos**, 423p., São Paulo: Varela,1996.

CHEN, W. C. Medium improvement for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus*. **Process Biochemistry**, v. 33, p.267-271, 1998.

CHIEN, C. S.; LEE, W. C.; LIN, T. J. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 29, p.252-257, 2001.

COPPA, G.V. et al. Prebiotics in human milk: a review. **Digestive And Liver Disease**, v. 38, n. 2, p.S291-S294, 2006.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 58, p.297-302, 2002.

DUAN, K. J.; CHEN, J. S.; SHEU, D. C. Kinetic Studies and Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 16, p.334-339, Apr. 1994.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrases from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v.32, n.3, p.237-243, mar.1997.

EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

FERNANDEZ, R. C. et al. Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 75, p.87-93, 2007.

GHAZI, I. et al. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal Of Biotechnology**, v. 128, p.204-211, 30 jan. 2007.

GIBSON, G.R.; WANG, X. Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. **Food Microbiology**, v. 11, p. 491-498, 1994.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated finishing with autofinish. **Genome Research**, v. 11, p. 614- 625, 2001.

HAULY, M.C.O.; MOSCATTO, J.A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, prebiotic effects and importance for food industry. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p.105-118, dez.2002.

HAYASHI, S. et al. Production of a novel syrup containing neofructo-oligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p.1465-1469, 2000.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microorganismos produtores de frutooligosacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões do Brasil**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HICKE, H.G. et al. Novel Enzyme-membrane reactor for polysaccharide synthesis. **Journal of Membrane Science**, v.16, n.1-2, p.239-245, ago.1999.

HISS, H.. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biociência Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. V.2, cap. 6, p. 93-122.

KAWAMURA, M. et al. Synthesis of a Series of Fructooligosaccharides with Sucrose and Cycloinulohexaose Extending over Ten Degrees of Polymerization Using Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase from *Bacillus circulans* OKUMZ 31B. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 72, n. 4, p.1119-1121, 2008.

KLEESEN, B. et al. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. **American journal of Clinical Nutrition**, v.65, p.1397-1402, 1997.

KIM, B.W.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Selective Production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1031-1034, 1998.

LEMOS, Adriane Cristina Garcia. **Efeito da suplementação de Frutooligosacarídeos (FOS) sobre o sistema Imunológico: estudo em ratos**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Departamento de Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

Li, W., et al. Study on nanofiltration for purifying fructooligosaccharides I. Operation modes. **Journal of membrane science**, v. 245, p.123-129, 2004.

LUND, B.M., WYATT, G.M. The nature of reducing compounds formed from sucrose by *Erwinia carotovora* var. atroseptica. **Journal of General Microbiology**, v.78, p. 331-336, 1973.

MARKOSYAN, A. A. et al. Production of Fructooligosaccharide Syrup from Sucrose in Combination with Palatinose and Trehalose. **Applied Biochemistry And Microbiology**, v. 43, n. 4, p.383-389, 2007

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.187-192, 1995.

NGUYEN, Q.D. et al. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Process Biochemistry**, v. 40, p.2461-2466, 2005.

NISHIZAWA, K.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H. Kinetic study on transfructosylation by (-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for Fructooligosaccharide production. **Food Science and Technology Research**, v.7, p. 39-44, 2001.

OK, T.; HASHINAGA, F. Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. **Journal Of General Applied Microbiology**, v. 43, p.39-47, 1997.

OLIVEIRA, I.M.A.; PARK, Y.K. Screening of β -fructofuranosidase producing microorganisms for production of fructooligosaccharides and studies of some enzyme properties. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 2, p.125-129, 1995.

OLIVEIRA, I.M.A. **Produção e caracterização da beta frutofuranosidase de *Aureobasidium* sp e sua aplicação na produção de fructooligosacarídeos.** 1997. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

PARK, J.P.; OH, T.K.; YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. **Process Biochemistry**, v. 37, p.471-476, 2001.

PARK, M.C. Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citinum*. **Biotechnology Letters**, v.27, p.127-130, 2005.

PARK, Y.K. et al. Produção de açúcares não convencionais: Isolamento de leveduras osmofílicas produtoras de eritritol e sua produção a partir de sacarose. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 22, p.22-2466, out. 2001.

PASSOS, L.M.L e PARK, Y.K. Fructooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, Wilibaldo et al. **Biociência Industrial**. São Paulo,SP: Edgard Blücher, 2001. V.2, cap. 16, p. 355-372.

ROZEN, R., STEINBERG, D., BACHRACH, G. Streptococcus mutans fructosyltransferase interactions with glucans. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 39-43, 2004.

SÁNCHEZ, O., et al. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food and Bioproducts Processing*, v.86, n.2, p.109-115, jun., 2008.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v.39, p.753-758, 2004.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends In Food & Technology**, v. 16, p.442-457, 2005a.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G.. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1085-1088, 2005b.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. **Journal Of Food Engineering**, v. 68, p.57-64, 2005c.

SANTOS, A. M.P.; MAUGERI, F. Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Food Technology And Biotechnology**, v. 45, n. 2, p.181-186, 2007.

SHEU, D.C. et al. Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzymesystem of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. **Biotechnology Letters**, v. 23, p.1499-1503, 2001.

SHEU, D.C. et al. Continuous Production of High-Content Fructooligosaccharides by a Complex Cell System. **Biotechnology Progress**, v. 18, p.1282-1286, 2002.

SHIN, H.T. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, n. , p.52-62, 2004.

SHIOMI, N.; YAMADA, J e IZAWA, M. Synthesis of a several fructo-oligosaccharides by asparagus fructosyltransferase. **Agricultural & Biological Chemistry**, v. 43, p. 2233-2244, 1979.

STRAATHOF, A. J.J.; KIEBOOM, A. P.G.; BEKKUM, H. V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. **Carbohydrate Research**, n.146, p.154-159, 1986.

SUN, Xiao-Jun, et al. Study on production process of high-content fructooligosaccharides. **Material Science and Technology**. v.13, n.3, 2005, p.305-307,311. Abstract.

TRUJILLO, L.E. et al. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, n.2-3, p.139-144, fev.2001.

Usina da Barra S/A. - Açúcar e Álcool (BR/SP), Park, Y.K. e Pastore, G.M., Campinas, BR/SP. **Processo para obtenção da enzima beta frutofuranosidase e processo para produção de frutooligosacarídeos**. PI9700452-9.25/03/1997.

VALADÃO, R.C. **Estudo da fermentação semi-sólida de uma linhagem de uma linhagem selecionada de *Aspergillus niger* na produção de inulinase**. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Sorópedica, 2005.

VITOLLO, Michele. Reatores com enzimas imobilizadas. In: SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 16, p. 355-372. (2).

YUN, Jong Won. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 19, p.107-117, 1996.

YUN, Jong Won; SONG, Seung Koo. Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Sucrose. In: BUCKE, Christopher (Comp.). **Carbohydrate Biotechnology Protocols: Methods in Biotechnology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999. Cap. 12, p. 141-152

