

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS
POR *Zymomonas mobilis*

Andréa Vasconcelos Lobato

RECIFE - 2003

Andréa Vasconcelos Lobato

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS
POR *Zymomonas mobilis*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Glícia Maria Torres Calazans

Recife – 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Ana Maria Santos Cabral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

**COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS**

Professora Dra. Alda de Andrade Chiappeta

**VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA
DE PRODUTOS BIOATIVOS**

Professora Dra. Juliana Ferreira Cavalcanti

*Aos meus pais Walter R. Furtado Lobato
e Maria de Fátima Vasconcelos Lobato;*

*Às minhas irmãs Patrícia Vasconcelos Lobato
e Andreza Vasconcelos Lobato*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs, meus maiores incentivadores.

A Prof^a Glícia Maria Torres Calazans por ter sido mais do que orientadora em muitos momentos durante a realização deste trabalho. Minha gratidão pelos ensinamentos passados.

A Bartolomeu pelo incentivo, paciência e carinho ao me acompanhar em todos os momentos.

Aos amigos do mestrado Ana Rosa Galdino Bandeira, Antônio Mário Melo, Iêda Cristina da Silva Vicente, Josimar Alves de Santana, Laudelina Rodrigues Magalhães, Maria Betânia Delmiro dos Santos, Maria do Socorro Duarte, Maria Tereza Corrêa Lima, Patrícia Maria Sobral de Oliveira, Leila Monteiro, Gláucia Manoella de Souza Lima e Ivanilda Ramos de Melo. Um especial agradecimento a todos.

A Karoly Muniz de Sá pela importante ajuda prestada na confecção desta dissertação.

Aos professores do mestrado por repassarem seus conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos pela boa vontade ao prestar seus serviços.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Fermentativos Adriana Gaspar Vilaça, Danilo Mamede, Christine Lamenha e Gilvanda, em especial a Cynthia

Gisele de Oliveira Coimbra e Marcela Clementino de Araújo, pela colaboração, ajuda e amizade em todos os momentos. Nunca vou esquecer de vocês.

A Dr^a Éster Ribeiro Gouveia e ao Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Professor José Otamar Falcão de Moraes pela sua gentil colaboração.

A todos que participaram e me ajudaram a chegar até o final desta jornada.

SUMÁRIO

Lista de figuras	01
Lista de abreviaturas e siglas	02
Lista de tabelas	03
Resumo	05
Abstract	06
1. INTRODUÇÃO	07
2. REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1. Oligossacarídeos	09
2.2. Processos fermentativos para produção de oligossacarídeos por <i>Zymomonas mobilis</i>	13
2.3. Métodos de identificação e dosagem de oligossacarídeos	16
2.4. Aplicação	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Microrganismo	20
3.2. Manutenção da linhagem	20
3.3. Meios de cultura	20
3.4. Análise das amostras de fermentação resultantes da produção de levana	21
3.5. Preparação do inóculo	22
3.6. Produção de oligossacarídeos em diferentes temperaturas	23
3.6.1. Acompanhamento das fermentações	23
3.6.2. Fermentações a 35 e 40°C	25

3.6.3 Estudo cinético da produção de oligossacarídeos <i>por Zymomonas mobilis</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Fermentações a 35 e 40°C	27
4.2. Estudo cinético	34
5. CONCLUSÕES	41
6. SUGESTÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 ⇒ Biorreator modelo Bioflow III (New Brunswick) tipo tanque agitado, usado na fermentação realizada para estudo cinético da produção de oligossacarídeos.....26
- Figura 02 ⇒ Resultados, em g/L, da variação do consumo de sacarose, biomassa e levana produzidas e variação de pH no estudo cinético realizado a 30°C.....37
- Figura 03 ⇒ Gráfico apresentando os DP de oligossacarídeos produzidos ao longo de 72 h de fermentação com *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meio de sacarose a 30°C, 150 g/L de sacarose inicial e agitação 100 rpm.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP (Degree of Polymerization) \Rightarrow Grau de polimerização

CLAE \Rightarrow Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ART \Rightarrow Açúcares Redutores Totais

ML \Rightarrow Meio de produção de levana

MPF \Rightarrow Meio de pré-fermentação

SSDL \Rightarrow Meio Standard de Swings & De Ley

S_0 \Rightarrow Concentração inicial de sacarose (g/L)

T \Rightarrow Temperatura ($^{\circ}$ C)

μ_x \Rightarrow Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_L \Rightarrow Velocidade específica de formação de levana (h^{-1})

μ_s \Rightarrow Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})

$Y_{L/S}$ \Rightarrow Fator de conversão de levana por substrato consumido

$Y_{L/X}$ \Rightarrow Fator de conversão de levana por células presentes no meio

$Y_{X/S}$ \Rightarrow Fator de conversão de células por substrato

$Y_{O/S}$ \Rightarrow Fator de conversão de oligossacarídeos por substrato consumido

$Y_{O/X}$ \Rightarrow Fator de conversão de oligossacarídeos por células

nRIU x s \Rightarrow Nano unidades de índice de refração por segundo

TF \Rightarrow Tempo de fermentação

P_{LEV} \Rightarrow Produtividade de levana ($g/L.h^{-1}$)

P_{OLIGO} \Rightarrow Produtividade de oligossacarídeos ($g/L.h^{-1}$)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 ⇒ Resultados apresentados por Melo (2002) e Coimbra et al. (2002) a partir do planejamento fatorial para otimizar a produção de levana, com 72 h de fermentação e 10 % de inóculo centrifugado. Os resultados apresentados são médias aritméticas dos valores obtidos em triplicata.....28
- Tabela 02 ⇒ Produtividades e rendimentos obtidos a partir dos dados apresentados por Melo (2002) e Coimbra et al. (2002), empregando o planejamento fatorial para otimização do processo de produção de levana.....28
- Tabela 03 ⇒ Resultados do Experimento 01 a temperatura de 40°C, concentração inicial de sacarose de 250 g/L e agitação de 100 rpm, com 72 h de fermentação.....29
- Tabela 04 ⇒ Resultados das análises de oligossacarídeos expressos por unidade de área (nRIU x segundo) dos picos cromatográficos, e seus respectivos DP no Experimento 01, com 72 h de fermentação, a 40°C.....32
- Tabela 05 ⇒ Resultados das análises de oligossacarídeos, expressos por unidade de área (nRIU x segundo) dos picos cromatográficos, e seus respectivos DP em fermentação a 30°C, realizada por Coimbra (2002).....33
- Tabela 06 ⇒ Resultados de consumo de sacarose, pH, biomassa produzida, levana produzida no estudo cinético da produção de oligossacarídeos a 30°C, 150g/L de sacarose inicial e agitação 100 rpm, por tempo de fermentação com *Zymomonas mobilis* ZAG-12.....35

Tabela 07 ⇒ Rendimentos e variações das velocidades específicas no estudo cinético da produção de oligossacarídeos a 30°C, por *Zymomonas mobilis* ZAG-12.....36

Tabela 08 ⇒ Resultados das análises de oligossacarídeos por CLAE, expressos como unidade de área dos picos cromatográficos, no estudo cinético a 30°C.....39

Tabela 09 ⇒ Resultados das análises de oligossacarídeos, por CLAE, expressos por unidade de área dos picos cromatográficos, no estudo cinético ao final do processo, com 72 h de fermentação, a 30°C.....40

RESUMO

Oligossacarídeos são carboidratos de baixo peso molecular produzidos por organismos vivos, com funções relacionadas à defesa imunológica, à replicação viral, ao crescimento e adesão celular e ao armazenamento de energia. Os oligossacarídeos são alimentos funcionais por suas propriedades prebióticas, estimulando a microbiota intestinal e contribuindo para o melhoramento da fisiologia do organismo. Neste trabalho estudou-se a produção de oligossacarídeos por via fermentativa, usando *Zymomonas mobilis* ZAG-12, além de analisar por CLAE os oligossacarídeos produzidos. Para isso foram realizadas fermentações em meio a base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais, conforme estudo realizado previamente para otimização do processo. Foram realizados dois experimentos adicionais às temperaturas de 35 e 40°C, 250 g/L de sacarose inicial e 100 rpm. O pH, a biomassa produzida, a sacarose consumida e a produção de levana e de oligossacarídeos foram analisados. A partir dos resultados obtidos foi realizado estudo cinético da produção de oligossacarídeos em biorreator, a 30°C, 150 g/L de sacarose, a 100 rpm, em processo descontínuo, por 72h. O rendimento em levana foi considerado baixo nas temperaturas de 35 e 40°C, fato atribuído ao favorecimento de outros produtos, inclusive oligossacarídeos. Oligossacarídeos com DP entre 3 e 15 foram encontrados a 35 e 40°C, com predominância dos DP 3, 5, 6, 12, 13 e 15. Na produção a 30°C foi observada a presença de oligossacarídeos com graus de polimerização entre 4 e 15, havendo maior produção dos DP 4, 5, 6, 7, 8 e 15. Os resultados mostram que *Zymomonas mobilis* ZAG-12 é uma produtora potencial de oligossacarídeos e que as temperaturas de 30, 35 e 40°C são favoráveis à sua produção. Concluiu-se que a temperatura de 40°C é a melhor para produção de oligossacarídeos com baixo DP e que as referidas temperaturas, de uma forma geral, não são favoráveis à produção de oligossacarídeos com elevado DP. Entretanto, em termos de rendimento final em oligossacarídeos, 30 °C apresentou-se como a melhor temperatura de processo.

ABSTRACT

Oligosaccharides are low molecular weight carbohydrates synthesised by living organisms, related with immune defence, viral replication, cell growth, cell-cell adhesion and energy storage. Furthermore, they are considered functional foods as a result of their prebiotics properties, which stimulate the intestinal micro flora improving the organic physiology. In this work, the production of oligosaccharides by *Zymomonas mobilis* strain ZAG-12 was studied. Fermentations in sucrose medium containing yeast extract and mineral salts were developed based on previous experiments using factorial method for optimisation. Analyses of the produced oligosaccharides by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were done. Additional experiments in flasks at 35 and 40°C sucrose 250 g/L, at 100 rpm of agitation were developed. The pH, biomass, levan and oligosaccharides produced and sucrose consumed were analysed. Finally, a kinetic study in a bioreactor Bioflow III (New Brunswick), using medium with sucrose 150 g/L, at 30 °C, 100 rpm, in batch fermentation process, during 72 h was carry out. The levan production was considered low at 35 and 40 °C, possibly due to by-products formation including oligosaccharides. Oligosaccharides with polymerisation degrees (DP) between 3 and 15 at 35 and 40 °C was detected. The predominating DP were 3,5,6,12,13 and 15 at these temperatures. In the production at 30°C it was observed oligosaccharides with DP between 4-15, with higher production of 4, 5, 6, 7, 8 e 15 degrees. The results show that *Zymomonas mobilis* strain ZAG-12 is a potential oligosaccharide producer and that 30, 35 e 40°C are better temperatures for oligosaccharide production. Oligosaccharides with low degree of polymerisation are formed mainly at 40°C, but the best yield was observed at 30 °C.

1. INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, a busca por uma melhor qualidade de vida conduz a uma constante necessidade de introduzir na dieta novos produtos, preferencialmente de origem natural. Um avanço neste campo é representado pelos oligossacarídeos, cujas propriedades favorecem seu uso na alimentação humana. Um grupo de oligossacarídeos vem despertando interesse comercial por contribuírem para a saúde favorecendo o bom funcionamento orgânico: os frutooligossacarídeos (KAPLAN & HUTKINS, 2000).

No Japão, pioneiro na produção em larga escala, os frutooligossacarídeos são considerados como alimentos e são encontrados em mais de 500 produtos disponíveis comercialmente, o que revela um consumo significativo destes açúcares (SPIEGEL et al., 1994). Industrialmente, os oligômeros de frutose são produzidos em batelada usando enzima solúvel ou, continuamente, utilizando enzima ou células imobilizadas (YUN, 1996).

O principal foco dado aos frutooligossacarídeos se refere a suas propriedades benéficas sobre a flora intestinal. Estes oligossacarídeos estimulam o desenvolvimento e a atividade das bifidobactérias e lactobacilos pertencentes a flora intestinal produzindo ácidos, principalmente os ácidos acético e láctico, que impedem o crescimento de patógenos. Devido a esta propriedade os frutooligossacarídeos são considerados como prebióticos, ou seja, ingredientes alimentares não digeríveis pelo hospedeiro, com efeitos benéficos sobre este devido ao estímulo seletivo, crescimento e/ou ativação do metabolismo de um ou limitado número de bactérias promotoras de saúde, no trato intestinal, melhorando assim a fisiologia intestinal do hospedeiro (ROBERFROID, 1997).

Outro enfoque é dado para suas propriedades como adoçante. Eles apresentam cerca de um terço do sabor doce apresentado pela sacarose. Os frutooligossacarídeos são também isentos de calorias, podendo ser usados por

diabéticos (YUN, 1996). Isto se justifica em razão da escassa digestibilidade pelas enzimas salivares e do trato gastrointestinal superior, promovida pela configuração das suas ligações glicosídicas (ROBERFROID, 1997). Assim, os frutooligossacarídeos não servem como fonte de energia para o organismo. Por razões semelhantes, os mesmos não causam cárie dental (YUN, 1996).

Com os recentes avanços no estudo dos carboidratos, os oligossacarídeos estão abrindo portas para o esclarecimento dos processos biológicos e da evolução e terapia de algumas doenças, mostrando novas perspectivas para a Medicina (OSBORN & KHAN, 2000).

Este trabalho se propõe a estudar a produção de oligossacarídeos pela bactéria *Zymomonas mobilis*, tendo como objetivos:

⇒ Produzir oligossacarídeos por fermentação, a partir de sacarose, usando *Zymomonas mobilis* ZAG-12.

⇒ Estudar a influência de parâmetros de fermentação como temperatura, agitação e concentração inicial de sacarose na produção.

⇒ Analisar os oligossacarídeos produzidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Oligossacarídeos

Tradicionalmente os carboidratos têm sido associados ao armazenamento de energia e funções estruturais. Agora, com os atuais avanços da Glicobiologia, eles vêm sendo associados a muitos processos biológicos nos organismos vivos. Hoje os cientistas acreditam que os carboidratos podem dar muitas respostas sobre os verdadeiros “enigmas da medicina”. Estratégias envolvendo carboidratos têm sido desenvolvidas para o tratamento de doenças incluindo câncer e AIDS (OSBORN & KHAN, 2000).

Os oligossacarídeos são biomoléculas fascinantes que vêm ganhando importância devido a seu papel biológico em processos fundamentais. Eles estão associados à defesa imunológica, fertilização, replicação viral, infecção parasitária, crescimento celular, adesão célula-célula, degradação de coágulos sanguíneos e inflamação. Os oligossacarídeos freqüentemente estão localizados na superfície externa das membranas celulares desempenhando papel no reconhecimento e diferenciação celular, sendo excelentes carreadores de informações biológicas entre as células e dentro dos compartimentos celulares. Um exemplo são os grupos sanguíneos humanos, que são diferenciados por pequenas alterações na estrutura dos oligossacarídeos da superfície do eritrócito. O sistema imunológico, por sua vez, utiliza os carboidratos como marcadores de superfície para distinguir suas células das células estranhas (OSBORN & KHAN, 2000).

Alterações nos oligossacarídeos da superfície celular têm sido observadas em algumas doenças. Pesquisadores acreditam que os oligossacarídeos estejam envolvidos na progressão de doenças humanas como a AIDS e câncer. Uma glicoproteína (gp120) foi reconhecida por desempenhar um papel importante na

infectividade do vírus HIV. Foi demonstrado que esta glicoproteína está envolvida na ligação inicial do vírus à superfície de linfócitos T, subpopulação CD4, que são as células de defesa imunológica atacadas pelo vírus, com posterior invasão da célula e replicação viral. Esse ciclo viral se repetindo por muitos anos leva a falência imunológica e imunodeficiência, deixando o hospedeiro vulnerável a infecções oportunistas e outras doenças. Os oligossacarídeos presentes na gp120 são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas contra a AIDS. Glicoproteínas também têm sido identificadas como antígenos associados a tumores e estão envolvidas na progressão da doença. Seus componentes oligossacarídicos são eficientes marcadores para o diagnóstico do câncer e para monitorar a progressão da terapia antineoplásica. Estes marcadores também são úteis para o desenvolvimento de novas terapias (OSBORN & KHAN, 2000).

A Glicobiologia tem avançado muito no sentido de elucidar os mecanismos das doenças e propor uma alternativa terapêutica inovadora.

Novos medicamentos, com carboidratos em sua composição química, têm sido desenvolvidos para o tratamento de várias doenças, inaugurando a chamada “medicina doce”. Vários microrganismos patogênicos usam carboidratos para reconhecer e interagir com seus hospedeiros, e drogas análogas aos carboidratos de interação inibem o contato e o avanço do agente infeccioso. No campo da imunização, glicoconjugados têm sido estudados para o desenvolvimento de vacinas (MAEDER, 2002).

Os oligossacarídeos são moléculas simples. Por definição contêm de 2 a 10 unidades monossacarídicas (KENNEDY & WHITE, 1993). Entretanto encontram-se trabalhos na literatura onde diferentes autores referem-se a oligossacarídeos com DP de 14 (KENNEDY & WHITE, 1993) até 20 (MARX et al., 2000).

Os oligossacarídeos são açúcares de ocorrência natural que têm efeitos benéficos como ingredientes alimentares (SPIEGEL et al., 1994). Eles podem ser produzidos por plantas com destaque para *Helianthus tuberosus* (Jerusalém artichoke), *Asparagus officinalis* e *Cichorium intybus* (chicória) (YUN, 1996) mas microrganismos também podem produzi-los, podendo ser citados *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium* sp, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Claviceps*

purpurea, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium spinulosum* (YUN, 1996), incluindo *Zymomonas mobilis* (VIKARI & GISLER, 1986). Os frutooligossacarídeos são formados por reações de transfrutossilacção a partir de sacarose, a qual uma, duas ou três unidades de frutose são adicionadas por uma ligação glicosídica à unidade de frutose da sacarose (SPIEGEL et al., 1994). A enzima levanassacarase catalisa a reacção de síntese (DOELLE et al., 1993). Os frutooligossacarídeos mais comumente encontrados na natureza são 1-cetose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-β-frutofuranosilnistose (GF₄) encontrados naturalmente em plantas ou em produtos comercializados como Nutraflora e Raftilose (SPIEGEL et al., 1994; KAPLAN & HUTKINS, 2000).

Os frutooligossacarídeos são classificados em dois tipos: os extraídos de plantas como a chicória (*Cichorium intybus*), são denominados frutooligossacarídeos do tipo inulina, contendo ligações β-(2-1) entre as unidades de frutose. Os frutooligossacarídeos do tipo levana são obtidos de microrganismos, consistindo predominantemente de ligações β-(2-6). Os frutooligossacarídeos mais bem estudados são aqueles obtidos de chicória, do tipo inulina, conhecidos como fibras solúveis. Eles consistem de unidades de frutose unidas por ligações do tipo β-(2,1), diferindo entre si pelo DP. Existem muitos registros na literatura sobre este tipo de oligossacarídeos e muito já se sabe sobre seu papel biológico (MARX et al., 2000).

É fato também que os pesquisadores têm reivindicado estudos mais detalhados para oligossacarídeos tipo levana. Enquanto as pesquisas em oligossacarídeos estão ainda se ampliando e consolidando, os conhecimentos sobre polissacarídeos e suas aplicações surgiram em tempos mais remotos e representam um campo ainda em expansão.

Normalmente os oligossacarídeos são formados durante a reacção de catálise enzimática para síntese de polissacarídeos. Quando a reacção de transfrutossilacção é do tipo polirrepetitiva, leva a formação do polímero. Por outro lado, quando a transfrutossilacção é oligorrepetitiva formam-se oligossacarídeos (FEINGOLD et al., 1955). Os oligossacarídeos também podem ser obtidos por hidrólise a partir de um polímero de elevado DP (KENNEDY et al., 1989). Foi

registrado por Viikari & Gisler (1986), Viikari (1998) e Calazans (1997), que a formação de oligossacarídeos ocorre simultaneamente a biossíntese de levana na bactéria *Zymomonas mobilis*, e a enzima levanassacarase encontra-se envolvida na síntese de ambos.

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais que ocorrem na maioria dos organismos vivos, fazendo parte das vias principais do seu metabolismo energético ou como suas unidades estruturais. São polímeros de elevado peso molecular com mais de 10 unidades monossacarídicas, porém os polissacarídeos mais comumente encontrados na natureza têm entre 80 e 100 unidades. Muitos tipos diferentes de homopolissacarídeos são encontrados nos organismos vivos desempenhando diversas funções. O amido, por exemplo, é um polissacarídeo de reserva vegetal, enquanto o glicogênio ocorre nos animais e em alguns microrganismos com esta mesma função. Ambos são glicanas, ou seja, polímeros de glicose (KENNEDY & WHITE, 1993).

Muitos polissacarídeos microbianos estão associados à superfície celular porém os exopolissacarídeos estão totalmente dissociados da célula microbiana, apresentando considerável diversidade em composição e estrutura. Os exopolissacarídeos microbianos são produtos de interesse industrial devido a suas propriedades e facilidade de obtenção (SUTHERLAND, 1990).

As frutanas são polissacarídeos de frutose, que funcionam como material de reserva encontrado em muitas plantas e microrganismos. Elas têm como estrutura geral uma molécula de glicose ligada a múltiplas unidades de frutose. Em plantas podem ocorrer até 100 unidades de frutose em uma única molécula de frutana, entretanto as frutanas bacterianas chegam a ter 100.000 unidades.

Há diferentes tipos de frutanas presentes na natureza, as quais são diferenciadas devido ao tipo de ligação glicosídica entre as unidades de frutose. O primeiro grupo é o das inulinas, que são frutanas lineares onde as unidades de frutose apresentam ligações β -(2-1), encontrada em plantas. O segundo grupo é o das levanas contendo ligações β -(2-6) presentes em plantas e bactérias. As frutanas mistas fazem parte do terceiro grupo que consiste de ligações β -(2-1) e β -(2-6) entre as unidades de frutose e são frutanas ramificadas. As frutanas

encontradas em bactérias são do tipo levana, consistindo de ligações β -(2-6). A levana possui potencial para ser usada na indústria alimentícia como fonte de frutose e como agente espessante. Além destas, outras aplicações têm sido sugeridas para esta frutana como, por exemplo: emulsificante, estabilizante, agente encapsulante e carreador de sabor e fragrância (FUCHS, 1991). Este polímero é produzido por diferentes bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Arthrobacter* e também *Zymomonas*.

Vários autores têm confirmado a existência de atividade antitumoral e imunomoduladora em levanas produzida por *Zymomonas mobilis* (LIEPA et al., 1993; CALAZANS et al., 1997). Testes antitumorais foram realizados demonstrando atividade contra sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, ambos tumores experimentais de camundongos (CALAZANS et al., 1997). Posteriormente, CALAZANS et al. (2000), relacionaram a atividade antitumoral ao peso molecular do polímero, observando que uma faixa de peso molecular em torno de 210 000 apresentou o máximo de atividade inibitória contra sarcoma 180.

2.2. Processos fermentativos para produção de oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*

Parece ter sido em 1955 o primeiro registro da produção de oligossacarídeos por via fermentativa. Feingold et al. (1955) investigaram a formação de oligossacarídeos em *Aerobacter levanicum*. Uma série de frutooligossacarídeos foi formada de sacarose pela atividade fermentativa de células de *Aerobacter levanicum* e por uma solução de levanassacarase livre de células. Kohanyi & Dedonder, 1951; Dedonder & Noblesse, 1953; French & Wild, 1953, apud Feingold et al. (1955) relatam a formação de oligossacarídeos por *Bacillus subtilis* em processo desenvolvido para produção de levana. Os autores consideraram os oligômeros de frutose formados como levanas de cadeias curtas e intermediários na formação de levana. Na época, provas conclusivas sobre tais hipóteses não foram relatadas.

Por outro lado, estudos sobre a produção, por via fermentativa, de oligossacarídeos a partir de *Zymomonas mobilis* é tema relativamente recente.

O ressurgimento do interesse por *Zymomonas mobilis* a partir da década de 70 esteve direcionado para sua aplicação na produção industrial de etanol. Vários autores estudaram a aplicação da fermentação etanólica de *Zymomonas mobilis* para potencial produção de etanol em escala industrial (LYNESS & DOELLE, 1980; RIOS et al., 1982/83; FALCÃO DE MORAIS, 1982/83; CALAZANS et al., 1989). Rogers et al. (1982) observaram que *Zymomonas mobilis* é um excelente substituto para as leveduras na produção de etanol, obtendo uma produtividade cerca de três a cinco vezes superior a observada com as leveduras, com um rendimento de etanol a partir de glicose de até 97%.

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, aerotolerante, que utiliza a via Entner Doudoroff para metabolizar carboidratos (GIBBS & DeMOSS, 1951), utilizando apenas glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono e energia. Etanol e dióxido de carbono são os principais produtos do catabolismo quando *Zymomonas mobilis* cresce anaerobicamente a partir da glicose (SWINGS E DE LEY, 1977; SPRENGER, 1996). Entretanto a fermentação da sacarose pela bactéria conduz a uma diminuição no rendimento de etanol atribuído à formação de outros subprodutos de fermentação, tais como levana, sorbitol, ácido glucônico e frutooligossacarídeos (VIIKARI et al., 1986; CALAZANS et al., 1989).

A formação de levana é uma característica típica de *Zymomonas mobilis* crescendo em meio a base de sacarose (VIIKARI, 1988). Além de levanassacarase, *Z. mobilis* possui duas invertases, A e B. Invertase B hidrolisa a sacarose a glicose e frutose. Invertase A ainda não teve seu papel totalmente esclarecido (SPRENGER, 1996). A levana se forma a partir da sacarose mas não de glicose ou frutose. Inicialmente a sacarose é hidrolisada a glicose e frutose ou por uma invertase ou por levanassacarase (VIIKARI, 1988). A levanassacarase, transfere resíduos β -D-furanosil da sacarose para uma molécula aceptora. Se o acceptor for a frutose forma-se levana, mas se este for uma molécula de água ocorrerá a hidrólise em glicose e frutose (SWINGS & DE LEY, 1977; DOELLE et al., 1993):



Invertase, assim como a levanassacarase, é uma β -frutofuranosidase capaz de hidrolisar a sacarose em glicose mais frutose. Invertase, semelhante a levanassacarase, também catalisa reações de transfrutossilacção conduzindo a formação de levana e oligossacarídeos. Ao mesmo tempo em que há a formação de levana, polímero de frutose de elevado peso molecular, frutooligossacarídeos de baixo peso molecular também têm sido detectados (DOELLE et al., 1993).

Existem poucos estudos sobre quais parâmetros de fermentação influenciam a produção de frutooligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*. Foi demonstrado por Vigants et al. (1998) que a adição de sais de sódio e potássio ao meio de cultivo produz um efeito estimulante sobre a síntese de levana e etanol, devido a uma ativação direta da levanassacarase pelos sais. Os autores sugerem que a levanassacarase possui propriedade de enzima alostérica cujos ativadores heterotrópicos seriam o sódio e o potássio. Em investigação posterior, Vigants et al. (2000) avaliaram o efeito de sais minerais sobre a formação de frutooligossacarídeos e outros subprodutos por *Z. mobilis*. Assim, *Z. mobilis* foi cultivada em meio contendo sacarose com a adição de diferentes concentrações de NaCl ou KCl até 0.6 M. Os autores observaram que NaCl e KCl estimulam também a produção de frutooligossacarídeos, porém somente em baixas concentrações de sacarose. Isto foi demonstrado quando *Zymomonas mobilis* foi cultivada com 65% de sacarose e sais. Sob estas condições a adição dos sais não aumentou a formação de oligossacarídeos, ao contrário, provocou efeito inibitório na produção.

Crittenden & Doelle (1994), afirmam que a temperatura e a concentração de sacarose no meio são os parâmetros mais importantes que regulam a formação de levana e oligossacarídeos pela levanassacarase de *Zymomonas mobilis*. Os autores relatam que a baixas concentrações de sacarose, entre 10 e 15% e 25°C, são produzidos levana e etanol; enquanto a concentração de sacarose entre 50 e 70%, a 45-50°C, é favorável a síntese de frutooligossacarídeos.

Os frutooligossacarídeos já são produzidos pela indústria alimentícia e comercializados em alguns países. O primeiro passo para a transposição de qualquer processo fermentativo para a escala industrial, visando a utilização comercial de um produto, é a realização de um estudo cinético do processo. O estudo cinético de um processo fermentativo consiste no acompanhamento dos valores de concentração de biomassa (X), produto de interesse econômico (P) e substrato limitante (S) que compõe o meio de cultura, em função do tempo de fermentação. (BORZANI et al., 2001). Quando esses valores experimentais são plotados em função do tempo permite o traçado de curvas em que se representa as concentrações de biomassa, produto e substrato num dado processo. O estudo também fornece dados quantitativos sobre rendimentos, sobre as velocidades específicas de crescimento do microrganismo envolvido no processo, de consumo de substrato e formação de produto. O estudo da cinética de um processo fermentativo pode dar também informações sobre o tempo de duração do processo e indicar qual o melhor tempo de produção para um determinado produto e fazer comparações quantitativas entre as diferentes condições de cultivo (BORZANI et al., 2001).

2.3. Métodos de identificação e dosagem de oligossacarídeos

Existem várias técnicas cromatográficas aplicáveis à determinação de oligossacarídeos. As técnicas de cromatografia mais antigas, tais como a cromatografia em papel e em camada delgada frequentemente estão sendo substituídas por métodos mais modernos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gás-Líquido (GLC) e Cromatografia de Fluido Supercrítico (SFC) (CHURMS, 1990) para a análise de carboidratos. Entretanto, Moreira et al. (1998), desenvolveram um método simplificado para determinar a composição química dos biopolímeros xantana, gelana e clairana (produzido no CenBiot/UFPEL) por cromatografia em camada delgada com gel de sílica F₂₅₄, usando como eluente uma mistura de clorofórmio: metanol: ácido acético: água, 40:40:10:10 (v/v/v/v). Os polímeros foram hidrolisados completamente com HCl 2N

e submetidos à análise. A técnica mostrou-se eficiente na separação dos componentes dos polímeros estudados. Foram identificados os monossacarídeos da clairana (glicose, galactose e fucose), gelana (glicose e ramnose) e xantana (glicose e manose). Este método também mostrou-se mais rápido se comparado aos que utilizam papel.

Ainda em 1955, Feingold et al., utilizaram cromatografia em papel de filtro para identificar oligossacarídeos produzidos por *Aerobacter levanicum*, demonstrando, por esta técnica, a presença de hexoses (glicose, frutose), sacarose, levana e oligossacarídeos em suas fermentações.

Cromatografia em Camada Delgada, empregando sílica Kieselguhr G e dois sistemas de solventes constituídos de 1-propanol - acetato de etila - água, apenas variando suas proporções, foi proposta por Collins et al. (1971) para análise de frutooligossacarídeos obtidos de raízes de chicória (*Cichorium intybus* L.). Utilizando-se o sistema nas proporções 40:50:10 obtiveram melhor separação de frutooligossacarídeos com DP até 7-8, enquanto que o sistema 60:20:20 foi satisfatório para a separação dos oligossacarídeos possuindo DP de 2-20. Em 1976, Shiomi et al., isolaram e identificaram oito frutooligossacarídeos, com DP entre 3 e 5, de raízes de chicória. Metilaram e metanolizaram estes oligossacarídeos e os submeteram a cromatografia em papel, camada delgada e cromatografia gás-líquido.

Kennedy et al. (1989), estudaram o perfil cromatográfico de frutooligossacarídeos obtidos pela hidrólise de levana produzida por *Zymomonas mobilis* VTT-E-78082 em meio a base de sacarose. A levana foi precipitada do mosto fermentado com etanol e hidrolisada com ácido clorídrico 0.1 M a 100°C por 1h. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência desse material totalmente hidrolisado detectou apenas D-frutose demonstrando que a levana consiste apenas de unidades de frutose. Nova hidrólise com ácido sulfúrico 0,05 M, a 100°C por 3 minutos foi feita. Uma alíquota deste material foi injetada em uma coluna Bio-Gel P₂ (Bio-Rad Laboratories). A cromatografia de permeação em gel demonstrou oligossacarídeos com grau de polimerização até 14 com pesos

moleculares diferentes, revelados pelas posições de eluição dos picos cromatográficos, os quais correspondem ao DP do oligossacarídeo.

2.4. Aplicação

Atualmente, as pesquisas com oligossacarídeos mostram seu potencial como alimentos funcionais e fatores bifidogênicos (MARX et al., 2000). Os alimentos funcionais são conceituados como alimentos que contêm, em concentrações adequadas, uma combinação de componentes os quais afetam funções do organismo, tendo um efeito celular ou fisiológico positivo que possam justificar seus benefícios à saúde. O mais conhecido efeito dos oligossacarídeos, em particular dos frutooligossacarídeos, é a estimulação seletiva do crescimento de *Bifidobacterium*, assim, modificando significativamente a composição da microbiota do cólon. No cólon, os frutooligossacarídeos são fermentados pelas bifidobactérias e outras bactérias anaeróbias, reduzindo o pH no cólon, pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente ácido lático e ácido acético. Ácido propiônico e ácido butírico também são formados mas em menor proporção. O mecanismo aceito através do qual *Bifidobacterium* inibe o crescimento de outras bactérias é exatamente o efeito sobre o pH, causado pela intensa produção dos ácidos graxos (ROBERFROID, 1994).

Além do seu efeito prebiótico, alguns oligossacarídeos têm efeitos sistêmicos, em particular como moduladores do metabolismo dos lipídios e carboidratos (ROBERFROID, 1997). Estudos sugerem que eles modificam a concentração de lipídios no sangue, causando redução nos níveis de colesterol e triglicerídios (ROBERFROID, 1994).

Palatinose, um adoçante de origem natural ou sintética constituído de glicose e frutose, e vários oligossacarídeos tais como isomalttooligossacarídeos e frutooligossacarídeos têm surgido como adoçantes alternativos devido a uma demanda por alimentos de baixa caloria. Entre eles, os frutooligossacarídeos microbianos obtidos de sacarose têm atraído especial atenção. Isto se deve à elevada resistência dos frutooligossacarídeos à hidrólise ácida e enzimática (YUN,

1996; ROBERFROID, 1997). MARX et al. (2000) determinaram a resistência de frutooligossacarídeos com ligações do tipo β -(2,6) às enzimas do trato gastrointestinal superior. Eles realizaram um teste de digestão *in vitro* incubando uma série de amilases, proteases, pancreatina e tripsina com os frutooligossacarídeos e posteriormente analisaram a mistura, antes e após a hidrólise, por cromatografia. Verificaram que os frutooligossacarídeos de cadeia longa são mais resistentes à hidrólise ácida ou enzimática do que os de cadeia curta, demonstrando que eles atingem o cólon inalterados servindo como substrato para os microrganismos intestinais. Roberfroid (1997) atribui a resistência à hidrólise ácida e enzimática à configuração das ligações glicosídicas em oligossacarídeos extraídos de chicória. Marx et al. (2000), realizaram ainda testes de fermentação, colocando linhagens de *Bifidobacterium* em contato com β -(2,6)-frutooligossacarídeos com DP entre 2 e 20 e verificaram que estes foram fermentados pelas bactérias testadas, porém esta metabolização é espécie dependente e evidenciaram que a massa molecular do oligossacarídeo é fator decisivo na degradação pelas bifidobactérias. Wang e Gibson (1995) apud Roberfroid (1997) afirmam que os oligossacarídeos de chicória são seletivamente hidrolisados e fermentados pelas bifidobactérias devido à secreção de uma β -frutosidase a qual hidrolisa suas ligações β -(2,1).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

Para a realização deste trabalho foi utilizada *Zymomonas mobilis* linhagem ZAG-12 (DAUFPE 241) pertencente a coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Esta linhagem foi obtida pela fusão de esferoplastos das linhagens de *Zymomonas mobilis* ZAP (DAUFPE 205) e Ag 11 (DAUFPE 198) (FALCÃO DE MORAIS et al., 1984/85).

3.2. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM

A linhagem de *Zymomonas mobilis* foi conservada por transferência para tubos contendo meio SSDL. Os cultivos foram incubados a 30°C por 48 h e estocados sob refrigeração a 4°C. A cultura foi transferida a cada três meses para preservação da linhagem.

3.3. MEIOS DE CULTURA

Meio para manutenção da cultura de *Zymomonas mobilis* ZAG-12

A manutenção foi feita em meio SSDL, composto, em g/L, de: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0; com o pH ajustado para 6,5, antes da autoclavação, a 121°C por 15 minutos. (SWINGS & DE LEY, 1977; CALAZANS et al., 2000).

Meio de pré-fermentação

O meio utilizado para propagação do inóculo ou pré-fermentação (MPF) era composto, em g/L, de: sacarose 100,0; extrato de levedura 2,0; KH_2PO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0. A sacarose, o extrato de levedura e os sais foram autoclavados separadamente, a 121°C por 15 minutos.

Meio de produção

O meio de cultura empregado nas fermentações para a produção de oligossacarídeos foi o mesmo utilizado para produção de levana por *Zymomonas mobilis*, denominado meio ML (meio para produção de levana) (CALAZANS, 1987). Este tem a mesma composição do meio de pré-fermentação, variando-se a concentração de sacarose, de acordo com o planejamento experimental. A autoclavação seguiu os mesmos procedimentos utilizados para o MPF.

3.4. ANÁLISES DE AMOSTRAS DE FERMENTAÇÃO RESULTANTES DA PRODUÇÃO DE LEVANA

Fermentações de sacarose por *Zymomonas mobilis* ZAG-12, foram desenvolvidas previamente por Melo (2002), empregando o planejamento fatorial objetivando otimizar a produção de levana. A técnica do planejamento fatorial, no contexto da otimização de experimentos é aplicada para determinar as condições necessárias para obtenção de um produto (MASSART et al., 1997 apud MELO, 2002). É necessário, segundo Melo (2002), a determinação dos fatores (qualitativos e quantitativos) e o problema que se deseja estudar. Em seguida, precisa-se definir claramente qual objetivo se pretende alcançar com os experimentos para se determinar o tipo de planejamento experimental que será utilizado. Melo (2002) utilizou um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , onde estudou a influência de quatro variáveis no processo para produção de levana:

temperatura, agitação, concentração inicial de sacarose e concentração inicial de extrato de levedura.

Sabendo-se que durante a produção de levana há formação concomitante de oligossacarídeos, estes fermentados foram empregados para pesquisa de oligossacarídeos produzidos durante o processo. Dando seqüência ao projeto que visava o estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*, as amostras resultantes dos experimentos de otimização foram analisadas por Coimbra (2002) com o objetivo de selecionar as condições de processo favoráveis a produção de oligossacarídeos. Dessa forma planejou-se com um mesmo conjunto de fermentações obter-se dados sobre a formação de dois diferentes produtos, que ocorriam simultaneamente na fermentação. Além disso, seria possível verificar quais as condições de processo que deslocariam a reação enzimática favorecendo a polimerização da frutose à levana ou formação de oligômeros. Tais amostras, mantidas congeladas até a pesquisa, resultaram de diferentes condições de fermentação. Nestes experimentos foram variadas a temperatura entre 20, 25 e 30°C, a concentração inicial de sacarose entre 100, 200 e 250 g/l, o extrato de levedura entre 2,0; 3,5 e 5,0 g/l e a agitação em 50, 75 e 100 rpm. As diferentes combinações resultaram em nove experimentos realizados em triplicata. Alíquotas dos fermentados provenientes dos experimentos para otimização de levana foram analisados para pesquisa de oligossacarídeos formados. As análises para oligossacarídeos foram realizadas por CLAE, usando coluna ZORBAX-NH₂ (5µm, 4,6mm x 150mm). O cromatógrafo foi operado com fluxo de 1 mL/min, temperatura do forno e unidade ótica (detector de índice de refração) a 35°C e fase móvel de acetonitrila-água na proporção 78:22 (COIMBRA, 2002).

3.5. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Os inóculos das fermentações foram preparados a partir da cultura reativada em frascos de erlemeyer de 250 mL, sem agitação, a uma temperatura de 30°C por 18 horas.

3.6. PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE DIFERENTES TEMPERATURAS

Para efeito de comparação com os dados obtidos a partir do planejamento fatorial foram desenvolvidas duas fermentações adicionais, uma com temperatura 40°C, concentração inicial de sacarose 250 g/L e agitação 100 rpm, e outra com temperatura 35°C, a mesma concentração inicial de sacarose e mesma agitação.

3.6.1. ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES

As fermentações foram conduzidas por 72 h, com amostragem a cada 24 h para determinação dos parâmetros a seguir.

Biomassa celular

A biomassa foi determinada pelo método espectrofotométrico, com base em curva de calibração de células construída a um comprimento de onda de 660 nm (CALAZANS, 1997).

O método consistiu em centrifugar 10 mL da amostra por 20 minutos, a 5000 rpm. O precipitado de células foi ressuspenso em água destilada para balão volumétrico de 10 mL, diluído quando necessário, e sua absorvância medida a 660 nm.

Teste de esterilidade

Todas as etapas da fermentação foram avaliadas quanto a ausência de contaminantes pelo semeio em meio Agar Nutriente (AN) e Caldo Simples, seguido por incubação em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. *Z. mobilis* não cresce em meio AN devido à ausência de fatores essenciais ao seu crescimento, por isso o aparecimento de colônias no meio demonstra a presença de contaminantes na fermentação (CALAZANS, 1997).

Dosagem de sacarose

A dosagem da sacarose foi realizada pelo método colorimétrico do ácido dinitrossalicílico (DNSA) após hidrólise ácida da mesma para dosagem, como açúcares redutores totais, expressando-se os resultados em g/L (MILLER, 1959; CALAZANS et al., 1989; MELO, 2002).

As amostras de fermentação foram submetidas à hidrólise com ácido clorídrico diluído 1:2 durante 15 minutos, a uma temperatura entre 68-69°C. Posteriormente foram neutralizadas com soluções de hidróxido de sódio 10 e 40%, e diluídas em água destilada para enquadrar as amostras na faixa de resolução do método. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm.

Dosagem de levana

A levana produzida foi extraída do mosto fermentado por precipitação com 75% de etanol aproximadamente, adicionando-se à 5 mL de mosto isento de células, 15 mL de etanol absoluto. A mistura obtida foi centrifugada a 5000 rpm durante 20 min. O sedimento formado foi novamente dissolvido em água e re-precipitado (REISS & HARTMEIER, 1990).

Após a centrifugação, a levana foi dosada por peso seco, segundo Reiss & Hartmeier (1990), transferindo-se a levana precipitada para pesa-filtros tarados e levando-os a estufa a 110°C por 24 h. Após este período, os pesa-filtros foram pesados em balança analítica calculando-se a partir destas medidas, a concentração de levana produzida em g/L.

Dosagem de oligossacarídeos

Os oligossacarídeos foram analisados por CLAE utilizando coluna RESEX RSO (200 x 10.00 mm) e água como fase móvel. O cromatógrafo foi operado com fluxo de 0,3 mL/min e temperatura de 80 °C.

3.6.2. FERMENTAÇÕES A 35 e 40°C

Os experimentos 01 e 02 foram realizados em triplicata a temperatura de 40°C e 35°C, respectivamente, concentração inicial de sacarose 250 g/L e agitação 100 rpm, a fim de verificar a influência desses parâmetros na produção dos oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*.

As fermentações foram realizada por 72 h, em frascos Pyrex graduados com tampa rosqueada, e capacidade para 500 mL, contendo 300 mL de meio de fermentação. Os frascos foram colocados em mesa agitadora com temperatura controlada. O inóculo correspondeu a 10% (v/v) do volume de trabalho.

3.6.3. ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR *Zymomonas mobilis*

O estudo cinético do processo fermentativo para produção de oligossacarídeos foi realizado em biorreator Bioflow III (New Brunswick), tipo tanque agitado, com capacidade para 5 L de volume útil (Figura 01).

As condições de processo utilizadas no estudo foram selecionadas com base nos trabalhos de Coimbra (2002) e Melo (2002), que realizaram experimentos empregando o planejamento fatorial para estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Z. mobilis* ZAG-12. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, utilizando o referido método de otimização, o estudo cinético foi realizado a temperatura de 30°C, concentração inicial de sacarose 150 g/L e agitação 100 rpm, consideradas as melhores condições de processo para produção dos oligossacarídeos.

No experimento sobre a cinética de fermentações, foram fermentados por processo descontínuo, 4,5 L de meio ML contendo 10% de inóculo, durante 72 h, com retirada de amostras a cada 3 h nas primeiras 18 h de fermentação e a cada 24 h no tempo restante. Temperatura e agitação foram controlados durante todo o processo. Os parâmetros medidos foram pH, concentração de biomassa e

sacarose, produção de levana e oligossacarídeos, realizados pelos mesmos métodos anteriormente citados.



Figura 01. Biorreator modelo Bioflow III (New Brunswick) tipo tanque agitado, usado na fermentação realizada para estudo da cinética da produção de oligossacarídeos.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.FERMENTAÇÕES A 35 E 40°C

A escolha das temperaturas foi norteada pelas pesquisas de Calazans (1997). Ao trabalhar com a produção de levana por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 a 40°C, Calazans (1997) relatou que o aumento da temperatura entre 10 e 30°C conduz a uma elevação do peso molecular médio da levana produzida. Contudo, a elevação de temperatura na faixa de 30 a 40°C reduz o peso molecular médio registrando-se, neste intervalo, o menor peso molecular dentre todas as temperaturas ensaiadas.

Outro fator relevante na seleção das temperaturas dos experimentos 01 e 02 foram os trabalhos realizados por Melo (2002) e Coimbra (2002) empregando o planejamento fatorial. Melo (2002) realizou nove experimentos, em triplicata, no estudo de otimização do processo de produção de levana, entre estes, sete foram analisados por Coimbra et al. (2002) para pesquisa de oligossacarídeos. Os resultados da otimização, apresentados na Tabela 01, mostram que a melhor produção dos oligossacarídeos se dá em temperaturas acima de 30°C. Com base nestas observações, foram realizadas fermentações a 35 e 40°C com o objetivo de avaliar a influência destas temperaturas na produção de oligossacarídeos.

Tabela 01. Resultados apresentados por Melo (2002) e Coimbra et al. (2002) a partir do planejamento fatorial para otimizar a produção de levana, com 72 h de fermentação e 10 % de inóculo centrifugado. Os resultados apresentados são médias aritméticas dos valores obtidos em triplicata.

Exp.	S ₀ (g/L)	ART Consumido (g/L)	Temp. (°C)	Extrato Levedura (g/L)	Agitação (rpm)	Biomassa Produzida (g/L)	Levana produzida (g/L)	Oligos. produzidos (g/L)
0	200	64	25	3,5	75	1,92	4	48,83
1	150	19	20	2,0	50	0,66	4,7	22,03
2	250	34	20	2,0	100	0,77	14,67	4,81
3	150	106	30	2,0	100	1,35	1,71	116,38
5	150	130	20	5,0	100	3,11	8,4	74,45
7	150	141	30	5,0	50	3,00	1,5	66,66
8	250	135	30	5,0	100	3,54	4,2	17,67

Tabela 02. Produtividades e rendimentos obtidos a partir dos dados apresentados por Melo (2002) e Coimbra et al. (2002), empregando o planejamento fatorial para otimização do processo de produção de levana.

Parâmetros	Experimentos							
	Exp. 0	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 5	Exp. 7	Exp. 8	
P _{LEV}	0,05	0,06	0,20	0,02	0,12	0,02	0,06	
P _{OLIGO}	0,68	0,30	0,07	1,62	1,03	0,92	0,24	
Y _{L/S}	0,06	0,25	0,43	0,02	0,06	0,01	0,03	
Y _{O/S}	0,76	1,16	0,14	1,09	0,57	0,47	0,13	
Y _{X/S}	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	
Y _{L/X}	2,08	7,12	19,05	1,27	2,70	0,5	1,19	
Y _{O/X}	25,43	3,38	6,25	86,21	23,93	22,22	4,99	

A Tabela 03 apresenta os resultados do Experimento 01. Apesar da elevada temperatura, observa-se que, com 72 h de fermentação, houve um consumo de substrato de 34,09 g/L por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 a 40°C, obtendo-se 0,226 g/L de biomassa produzida. Contudo, o crescimento celular obtido a esta temperatura foi inferior ao crescimento alcançado por Calazans (1997), que obteve, com 24 h, cerca de 1,0 g/L de biomassa em fermentação a 40°C, com concentração inicial de sacarose de 200 g/L, usando a mesma linhagem. O baixo crescimento deve-se, provavelmente, à elevada concentração de sacarose (250 g/L) presente no meio de fermentação, uma vez que altas concentrações de açúcar levam ao estresse osmótico da célula (SPRENGER, 1996).

Tabela 03. Resultados do Experimento 01, a temperatura de 40°C, concentração inicial de sacarose de 250 g/L e agitação de 100 rpm, com 72h de fermentação.

Experimento 01	
Parâmetros	Resultados
Biomassa produzida (g/L)	0,226
ART consumido (g/L)	34,090
Levana produzida (g/L)	0,620
$Y_{L/S}$	0,020
$Y_{L/X}$	2,740
$Y_{X/S}$	0,007

De acordo com os resultados (Tabela 03), houve um consumo de 34,09 g/L de ART a 40°C, nos mesmos níveis do obtido por Calazans (1997) trabalhando nesta mesma temperatura. Calculando-se o fator de conversão de levana por substrato consumido a 40°C obteve-se: $Y_{L/S}$ de 0,02. Calazans (1997) trabalhando com a mesma linhagem alcançou um $Y_{L/S}$ de 0,04 a 35°C, no entanto, mantendo as demais condições de fermentação constantes e baixando a temperatura para 25°C o $Y_{P/S}$ foi de 0,25, seis vezes maior que a 40°C. A 30°C, superior a temperatura considerada como a melhor para produção de levana por Calazans (1997), fator de conversão de produto por substrato foi considerado baixo devido a esta condição ser favorável à formação de outros produtos finais de fermentação, como sorbitol, ácido glucônico e oligossacarídeos (VIKARI & GISLER, 1986). O fator de conversão de levana por células ($Y_{L/X}$) a 40°C foi de 2,74, superior ao encontrado por Calazans (1997) ($Y_{L/X} = 1,7$). Devido ao registro de um baixo peso molecular médio de levana nesta temperatura, pode-se supor que em temperaturas próximas a esta devem ser formados também oligossacarídeos. Como é mostrado na literatura, a produção de polímeros ocorre obedecendo a uma curva de distribuição de frações, de variados pesos moleculares, em formato gaussiano, cuja abertura poderá ser influenciada pela temperatura de processo empregada (CALAZANS, 1997).

Com relação à produção de levana, ainda observando-se a Tabela 03, foi produzido 0,62 g/L a 40°C. Calazans (1997) relata 1,4 g/L de levana produzida a esta temperatura, e apresenta 25°C como a melhor temperatura para produção do polímero dentro da faixa testada. Dando continuidade ao trabalho realizado por Melo (2002), Coimbra et al. (2002) selecionaram condições adequadas para produção de oligossacarídeos e também observaram que a produção de levana é favorecida por temperaturas mais baixas. Examinando-se a Tabela 01, concentração de 14,67 g/L de levana foi obtida no experimento a temperatura de 20°C (MELO, 2002), empregando a mesma agitação de 100 rpm e concentração inicial de sacarose de 250 g/L. Entretanto, em temperaturas mais elevadas que 25°C observou-se um incremento da produção de oligossacarídeos. Neste grupo

de experimentos foi observado que a 20°C e S_0 de 250 g/L a produção de oligossacarídeos foi de 4,81 g/L. Mantendo-se a temperatura e baixando-se a concentração inicial de sacarose para 150 g/L foi possível elevar a concentração de oligossacarídeos para 22,03 g/L com agitação de 50 rpm. A concentração de oligossacarídeos passou a 74,45 g/L mantendo-se a rotação em 100 rpm. Foi demonstrado que neste conjunto de variáveis, a concentração inicial de sacarose e agitação parecem interagir positivamente, na formação do produto (Coimbra, 2002).

Elevando-se a temperatura de 20°C para 25 °C, a uma concentração inicial de sacarose de 200 g/L e agitação de 75 rpm, observa-se uma concentração de oligossacarídeos (48,83 g/L) inferior ao máximo alcançado a 20°C (74,45 g/L). Entretanto a melhor interação de parâmetros ocorreu quando se reuniu num mesmo experimento S_0 de 150 g/L, agitação de 100 rpm e temperatura de 30°C (Coimbra, 2002) , obtendo-se uma concentração final de oligossacarídeos de 116,38 g/L, que corresponde a um rendimento em oligossacarídeos ($Y_{O/S}$) de 1,09 e elevado fator de conversão de oligossacarídeos ($Y_{O/X}$) de 86,21 (Tabela 02). Nesta mesma fermentação a levana foi de apenas 1,71 g/L, uma das produções mais baixas registradas.

As análises por CLAE dos fermentados obtidos a 30 e 40°C mostram que os oligossacarídeos produzidos na fermentação a 40°C apresentam predominantemente DP 3, 5, 6, 12, 13 e 15 (Tabela 04). Analisando-se as áreas correspondentes aos picos detectados nos cromatogramas é possível inferir que entre estes, houve maior produção do DP 15 (área de $75,1 \times 10^4$ nRIU x s), seguidos pelos oligossacarídeos de DP 13 ($35,2 \times 10^4$ nRIU x s), DP 12 ($50,4 \times 10^4$ nRIU x s) e DP 5 ($41,8 \times 10^4$ nRIU x s). Confrontando estes dados com os trabalhos de Coimbra (2002), baseados nas análises por CLAE de fermentação realizada a 30°C, concentração inicial de sacarose 150 g/L e agitação 100 rpm, verificou-se a produção de oligossacarídeos com DP 4, 5, 6, 7, 8 e 15. Os oligossacarídeos com DP 5 ($41,8 \times 10^4$ nRIU x s) , 6 ($6,98 \times 10^4$ nRIU x s) e 15 ($75,1 \times 10^4$ nRIU x s), comuns às duas fermentações, tiveram maior produção a 40°C do que a 30°C (Tabelas 04 e 05). O DP 3 só foi detectado na fermentação a 40°C, o que sugere

esta temperatura como a mais favorável para produção de trissacarídeos dentre as demais testadas. Spiegel et al. (1994) mostram, citando Kamen (1992) e Fishbein et al. (1988), que 1-cetose (GF₂), nistose (GF₃) e 1^F-β-frutofuranosilnistose (GF₄), com DP 3, 4 e 5, respectivamente, são os oligossacarídeos de frutose mais comuns em uma variedade de frutas e vegetais. Os dados experimentais mostram que provavelmente os mesmos oligossacarídeos citados por Spiegel et al. (1994) sejam sintetizados por *Z. mobilis* ZAG-12, uma vez que *Z. mobilis*, em fermentações de sacarose, produz oligossacarídeos de frutose com DP 3, 4 e 5 (VIKARI et al., 1986; DOELLE et al., 1993), podendo ser uma alternativa para obtenção destes oligossacarídeos de cadeia curta empregando uma via fermentativa. Os DP 9, 10, 11 e 14 não foram observados na fermentação a 40°C e nem nos experimentos de Coimbra (2002) a 30°C.

Tabela 04. Resultados das análises de oligossacarídeos, expressos por unidade de área (nRIU x segundo) dos picos cromatográficos, e seus respectivos graus de polimerização nos Experimento 01, com 72 h de fermentação, a 40°C.

Experimento 01	
Grau de polimerização	Área dos picos (nRIU x s)
3	2,69x10 ⁴
4	0
5	41,8x10 ⁴
6	6,98x10 ⁴
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	50,4x10 ⁴
13	35,2x10 ⁴
14	0
15	75,1x10 ⁴

Tabela 05. Resultados das análises de oligossacarídeos, expressos por unidade de área (nRIU x segundo) dos picos cromatográficos, e seus respectivos graus de polimerização em fermentação a 30°C, realizada por Coimbra (2002).

Grau de polimerização	Área dos picos (nRIU x s)
3	0
4	46,08x10 ⁴
5	16,22x10 ⁴
6	2,32x10 ⁴
7	2,55x10 ⁴
8	1,89x10 ⁴
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0
15	13,50x10 ⁴

4.2. ESTUDO CINÉTICO

As condições para a realização do estudo cinético da produção de oligossacarídeos foram planejadas com base nos resultados de Coimbra et al. (2002), que utilizaram os resultados do planejamento fatorial para melhoria da produção de oligossacarídeos. O planejamento indicou a temperatura de 30°C, concentração inicial de sacarose de 150 g/L e agitação de 100 rpm como as melhores condições para produção de oligossacarídeos por *Z. mobilis* ZAG-12.

Os resultados de sacarose consumida, biomassa e levana produzidas, bem como os rendimentos e velocidades específicas no experimento, por tempo de fermentação, são mostrados nas Tabelas 06 e 07. De acordo os resultados, ao final da fermentação (72 h), foram consumidos 55 g/L de sacarose, menos do que consumido em fermentação a 30°C (76,1 g/L) realizada por Coimbra et al. (2002), atingindo sua maior velocidade específica ($\mu_P = 14,27 \text{ h}^{-1}$) de consumo de substrato com 9 h de fermentação.

O rendimento em levana ($Y_{L/S}$) obtido foi de 0,15, superior ao encontrado por Calazans (1997) a 35°C (0,04), devido a temperatura ser mais alta do que a melhor temperatura de produção de levana considerada pelo autor. A levana obtida ao final do processo foi 2,37 g/L, produção nos mesmos níveis do obtido por Calazans (1997) (2,2 g/L) a 35°C.

A biomassa produzida no estudo cinético foi de 1,51 g/L e sua velocidade específica máxima de crescimento, calculada no intervalo entre 0 e 12 h de fermentação, foi de $0,14 \text{ h}^{-1}$, período em que *Z. mobilis* se encontra na fase logarítmica de crescimento.

De acordo com a Figura 02, pode-se observar que a produção de levana acontece concomitantemente ao crescimento de *Z. mobilis*, fato também observado por Calazans (1997) em estudo cinético realizado a 25°C. A maior velocidade específica de produção de levana foi de $6,90 \text{ h}^{-1}$ atingida com 3 h de fermentação.

Tabela 06. Resultados de consumo de sacarose, pH, biomassa produzida, levana produzida no estudo cinético da produção de oligossacarídeos a 30°C, 150g/L de sacarose inicial e agitação 100 rpm, por tempo de fermentação com *Zymomonas mobilis* ZAG-12.

TF (h)	Sacarose (g/L)	Consumo de sacarose (g/L)	Biomassa Produzida (g/L)	Levana produzida (g/L)	pH
T ₀	150	0	0	0	4,8
T ₃	-	-	0,04	0,81	4,8
T ₆	145	05	0,18	2,06	4,3
T ₉	124	20	0,35	1,98	4,0
T ₁₂	107	17	0,83	2,09	3,7
T ₁₅	111	-	0,85	0,89	3,5
T ₁₈	108	03	1,11	0,73	3,4
T ₂₁	115	-	1,28	1,37	3,4
T ₂₄	-	-	1,36	1,79	3,5
T _{29,5}	112	03	1,54	1,81	3,4
T ₄₈	-	-	1,52	2,03	3,5
T ₅₆	109	03	1,44	2,42	3,5
T ₇₂	95	14	1,51	2,37	3,2

(-) Valores não calculados devido a perda de amostras.

Tabela 07. Rendimentos e variações das velocidades específicas no estudo cinético da produção de oligossacarídeos a 30°C, por *Zymomonas mobilis* Zag-12.

TF (h)	Y(L/s)	Y(L/x)	Y(x/s)	μ_x	μ_L	μ_s
0	0	0	0	0	0	0
3	-	20,80	-	0,330	6,900	-
6	0,39	11,60	0,03	0,260	2,350	-
9	0,10	5,60	0,02	0,170	-	14,27
12	0,12	2,50	0,05	0,190	0,050	-
15	-	1,03	-	0,010	0	-
18	0,27	0,65	0,41	0,080	0	0,82
21	-	1,06	-	0,040	0,160	-
24	-	1,30	-	0,017	0,100	-
29,5	0,61	1,20	0,52	0,021	0,003	-
48	-	1,30	-	-	0,008	-
56	0,57	1,70	0,45	-	0,030	-
72	0,15	1,60	0,11	0,002	-	0,44

(-) Valores não calculados devido a perda de amostras.

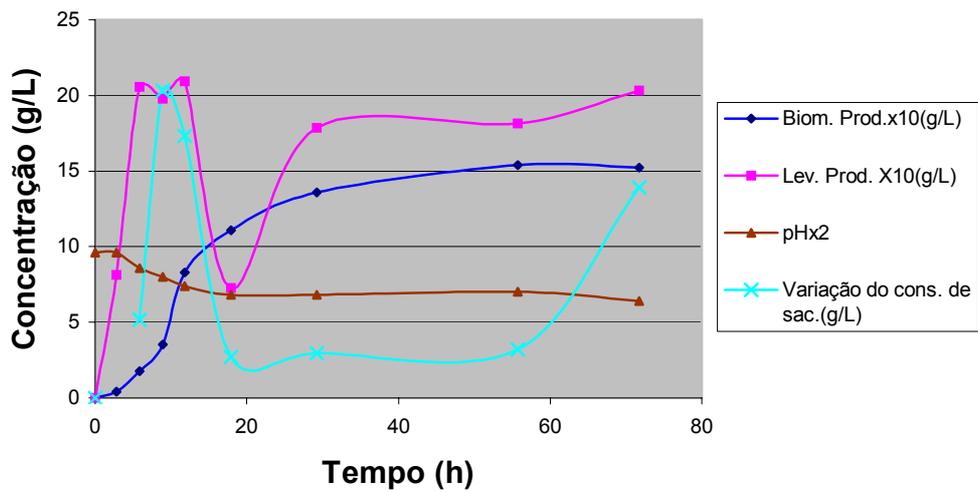


Figura 02. Resultados, em g/L, da variação do consumo de sacarose , biomassa e levana produzidas e variação do pH no estudo cinético realizado a 30°C.

Os resultados da cinética de fermentação (Tabelas 08 e 09) revelam oligossacarídeos com DP numa faixa entre 4 e 15 nas 72 h de fermentação (Figura 02). Os dados mostram oligossacarídeos com DP 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 15, em concordância com os resultados encontrados por Coimbra (2002) na fermentação a 30°C, com as mesmas condições de fermentação (Tabela 05).

De acordo com a Figura 02, observa-se que houve maior produção de oligossacarídeos com DP 12, com o pico de sua produção em aproximadamente 24h de fermentação, sendo que o mesmo DP não foi observado por Coimbra (2002) em fermentação a 30°C. Segue-se o DP 4 e o DP 5 com produção máxima com 21h e 24 h de fermentação, respectivamente. Oligossacarídeos com DP 3 não foram observados

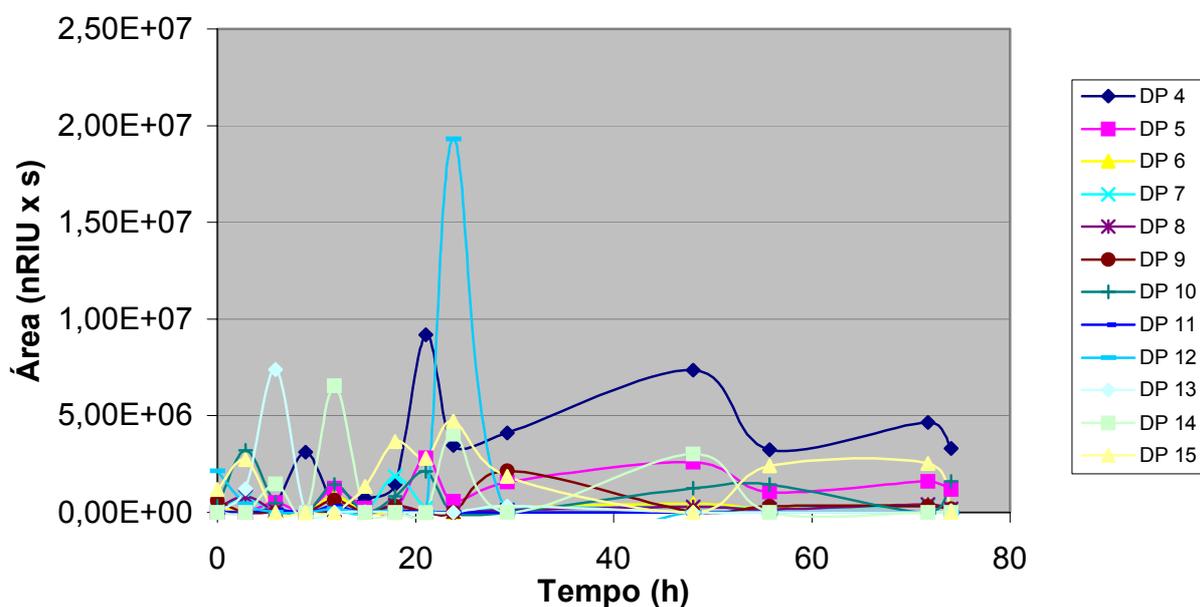


Figura 03. Gráfico apresentando os DP de oligossacarídeos produzidos ao longo de 72 h de fermentação com *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meio de sacarose a 30°C, 150 g/L de sacarose inicial e agitação 100rpm.

Tabela 08. Resultados das análises de oligossacarídeos por CLAE, expressos como unidade de área dos picos cromatográficos, no estudo cinético a 30°C.

TF (h)	DP 4	DP 5	DP 6	DP 7	DP 8	DP 9	DP 10	DP 11	DP 12	DP 13	DP 14	DP 15
0	4,89 $\times 10^4$	0	1,95 $\times 10^5$	5,19 $\times 10^4$	2,14 $\times 10^5$	6,19 $\times 10^5$	3,32 $\times 10^5$	0	2,16 $\times 10^6$	0	0	1,19 $\times 10^6$
3	0	0	1,63 $\times 10^5$	7,37 $\times 10^5$	8,34 $\times 10^5$	0	3,20 $\times 10^6$	0	4,66 $\times 10^5$	1,21 $\times 10^6$	0	2,72 $\times 10^6$
6	5,06 $\times 10^5$	5,11 $\times 10^5$	2,03 $\times 10^4$	7,27 $\times 10^4$	1,05 $\times 10^5$	0	4,88 $\times 10^5$	1,21 $\times 10^5$	0	7,39 $\times 10^6$	1,49 $\times 10^6$	0
9	3,12 $\times 10^6$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	4,89 $\times 10^5$	1,25 $\times 10^6$	8,31 $\times 10^5$	1,13 $\times 10^5$	1,24 $\times 10^5$	6,49 $\times 10^5$	1,45 $\times 10^6$	3,23 $\times 10^5$	1,81 $\times 10^5$	0	6,57 $\times 10^6$	0
15	7,49 $\times 10^5$	2,34 $\times 10^5$	0	0	0	0	3,29 $\times 10^4$	8,19 $\times 10^3$	0	2,84 $\times 10^4$	0	1,35 $\times 10^6$
18	1,45 $\times 10^6$	1,39 $\times 10^5$	0	1,86 $\times 10^6$	3,79 $\times 10^5$	3,21 $\times 10^5$	8,49 $\times 10^5$	1,29 $\times 10^5$	1,53 $\times 10^5$	0	0	3,67 $\times 10^6$
21	9,20 $\times 10^6$	2,83 $\times 10^6$	0	2,33 $\times 10^6$	0	0	2,13 $\times 10^6$	0	0	0	0	2,79 $\times 10^6$
24	3,47 $\times 10^6$	5,75 $\times 10^6$	0	0	0	0	0	0	1,93 $\times 10^7$	0	4,03 $\times 10^6$	4,71 $\times 10^6$
29,5	4,11 $\times 10^6$	1,58 $\times 10^6$	2,73 $\times 10^5$	1,97 $\times 10^5$	1,18 $\times 10^5$	2,16 $\times 10^6$	0	0	0	3,07 $\times 10^6$	0	1,86 $\times 10^6$
48	7,37 $\times 10^6$	2,61 $\times 10^6$	4,35 $\times 10^5$	2,77 $\times 10^6$	3,01 $\times 10^5$	2,44 $\times 10^4$	1,27 $\times 10^6$	0	0	0	3,02 $\times 10^6$	0
56	3,25 $\times 10^6$	1,06 $\times 10^6$	2,36 $\times 10^5$	1,86 $\times 10^6$	1,49 $\times 10^5$	3,23 $\times 10^5$	1,46 $\times 10^6$	0	0	0	0	2,40 $\times 10^6$
72	4,66 $\times 10^6$	1,62 $\times 10^6$	4,28 $\times 10^5$	3,07 $\times 10^5$	4,03 $\times 10^5$	3,33 $\times 10^5$	0	0	0	0	0	2,55 $\times 10^6$

Tabela 09. Resultados das análises de oligossacarídeos, por CLAE, expressos por unidade de área dos picos cromatográficos, no estudo cinético ao final do processo, com 72 h de fermentação, a 30°C.

Estudo cinético	
Grau de polimerização	Área dos picos (nRIU x s)
3	0
4	46,6 x10 ⁵
5	16,2x10 ⁵
6	4,28 x10 ⁵
7	3,07 x10 ⁵
8	4,03 x10 ⁵
9	3,33 x10 ⁵
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0
15	25,5 x10 ⁵

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos conduzem às seguintes conclusões:

- ↻ *Zymomonas mobilis* linhagem ZAG-12 é uma produtora de oligossacarídeos com potencialidade para produção em larga escala.
- ↻ A temperatura é um importante parâmetro na produção de oligossacarídeos por fermentação.
- ↻ Existe um efeito de interação positivo entre as variáveis temperatura, concentração inicial de sacarose e agitação na produção de oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis* ZAG-12.
- ↻ As temperaturas de 30, 35 e 40°C, mais elevadas que as consideradas ideais para produção de levana, são mais favoráveis à produção de oligossacarídeos.
- ↻ A temperatura mais favorável para produção de oligossacarídeos com baixo DP é 40°C, sendo também a mais indicada para produção de oligossacarídeos com DP 3 entre as temperaturas testadas.
- ↻ De acordo com os resultados, de um modo geral, as temperaturas de 30, 35 e 40°C não são favoráveis à produção de oligossacarídeos com DP elevado, com exceção do DP 12 e 15.
- ↻ Em termos de rendimento final em oligossacarídeos e seleção de parâmetros mais viáveis para o desenvolvimento de um processo industrial, com base neste estudo conclui-se que: 30°C, sacarose inicial de 150 g/L e agitação de

100 rpm como as condições mais adequadas para produção de oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis* ZAG-12.

6. SUGESTÕES

- ↗ Aquisição de padrões quantitativos de oligossacarídeos.
- ↗ Quantificar e determinar o perfil de oligossacarídeos nas condições estudadas.
- ↗ Testar a atividade fermentativa das bifidobactérias e lactobacilos frente aos oligossacarídeos produzidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. 2001. vol. 2. 541 p.

CALAZANS, G. M. T. **Fermentação Etanólica por *Zymomonas mobilis***. 1987. 135 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CALAZANS, G. M. T., RIOS, E. M. et al. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP em meio de sacarose. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 32, n. 4, p. 631-636. 1989.

CALAZANS, G. M. T. **Produção de levana para uso clínico**. 1997. 115 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CALAZANS, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. M. O. C. & FRANÇA, F. P. Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 1, p. 19-21. 1997.

CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C. *et al.* Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245-247. 2000.

CHURMS, S. C. Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. **Journal of Chromatography**, v. 500, p. 555-583. 1990.

COIMBRA, C. G. O. **Estudo da produção de levana e oligossacarídeos por *Zymomonas mobilis*** . Relatório final de iniciação científica, 2002.

COIMBRA. C. G. O. MELO, I. R. et al. **Estudo da produção de frutoligossacarídeos por *Zymomonas mobilis* ZAG-12**. XLII Congresso Brasileiro de Química, 2002.

COLLINS, F. W., CHANDORKAR, K. R. Thin-layer chromatography of fructo-oligosaccharides. **Journal of Chromatography**, v. 56, p. 163-167. 1971.

CRITTENDEN R., DOELLE, H. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* Uqm-2716(ATCC-39676). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 302-308. 1994.

DAWES, E. A., RIBBONS, D. W., REES, D. A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem J*, 98: 804-812, 1966. Apud: VIIKARI, L., GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* - strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 240-244. 1986.

DEDONDER, R., NOBLESS, M. **Ann. Inst. Pasteur**, 85, 356, 1953. Apud: FEINGOLD, D. S, AVIGAD, G. et al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. **Bioch.**, v. 64, p. 351-361. 1955.

DOELLE, H. W., KIRK, L. et al. *Zymomonas mobilis* – Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 57-98. 1993.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 21, n.1/2, p. 169-182. 1982/1983.

FALCAO DE MORAIS, J. O. et al. Spheroplasts of *Zymomonas mobilis* :production and regeneration. **Revista do instituto de Antibióticos**, v. 22, n. 1/2, :157-163, 1984/85.

FEINGOLD, D. S, AVIGAD, G. et al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. **Bioch.**, v. 64, p. 351-361. 1955.

FRENCH,D. & WILD, G. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 75, p. 2612. 1953. Apud: FEINGOLD, D. S, AVIGAD, G. et al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. **Bioch.**, v. 64, p. 351-361. 1955.

FUCHS, A. Current and potencial food and non-food aplication of fructans. **In: 638th Meeting Reading of the Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 3, p. 555-560. 1991.

GIBBS, M., De MOSS, R. D. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri* . **Arch. Biochem. Biophy.**, v. 34, p. 748-749. 1951.

GIBSON, G. R., WANG, X. et al. **Gastroenterology**, v. 108, p. 975-982. 1995 Apud: ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 09, p. 211-219. 1997.

KAPLAN, H., HUTKINS, R. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2682-2684. 2000.

KENNEDY, J.F., WHITE, C.A. Bioactive Carbohydrates: In chemistry, biochemistry and biology. **England: Ellis Horwood Limited, 1993. 319 p.**

KENNEDY, J. F., STEVENSON, C. A., WHITE, C.A. The chromatographic behaviour of a series of fructo-oligosaccharides derived from levan produced by

the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, p. 103-113. 1989.

KOHANYI, G. & DEDONDER, R. C. R. **Acad. Sci.**, n. 233, p. 1142. 1951. Apud: FEINGOLD, D. S, AVIGAD, G. et al. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. **Bioch.**, v. 64, p. 351-361. 1955.

LIEPA, V., ZAKENFELDS, G., VOLPE, E. et al. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing. **Proceedings of the Latvian Academic of Sciences**, v. 550, n. 5, p. 59-64. 1993.

LYNESS, E. D., DOELLE, H. W. Effect of Temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 12, p. 549-54. 1980.

LYNESS, E. W., DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*, **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 5, p. 345-350. 1983.

MAEDER, T. Sweet medicines. **Scientific American**, v. 287, n. 1, p. 24-31, July 2002.

MASSART et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics-part A. Elsevier, 1997. 884 p. Apud: MELO, I. R. **Aplicação do planejamento fatorial para maximizar a produção de levana**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MARX, S. P., WINKLER, S., HARTMEIER, W. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 163-169. 2000.

MELO, I. R. **Aplicação do planejamento fatorial para maximizar a produção de levana**. 2002. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Chemistry Analytical**, v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.

MOREIRA, A. da S. et al. Determinação da composição de biopolímeros por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 222-224. 1998.

OSBORN, H., KHAN, T. **Oligosaccharides-Their Synthesis and Biological Roles**. Oxford University Press. 2002. 112 p.

REISS, M., HARTMEIER, W. Levan Production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 69-75. 1990.

RIOS, E. M., FALCÃO DE MORAIS, J. O., ARAÚJO, J. M. Fermentação Alcoólica de mostos de melaço por cepas de *Zymomonas mobilis*. Estudo comparativo. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 2, n. 1/2, p. 139-149. 1982/1983.

ROBERFROID, M. B. & DELZENNE N. M. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. **Lebesm.-Wiss. U.-Technol.**, v. 27, p. 1-6. 1994.

ROBERFROID, M. B. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 09, p. 211-219. 1997.

ROGERS, P. L., LEE, K. J. et al. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 23, p. 27-82. 1982.

SPEIGEL, J. E., ROSE, R. et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v. 48, p. 85-89. 1994.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301-307. 1996.

SHIOMI, N., YAMADA, J., IZAWA, M. Isolation and Identification of fructooligosaccharides in roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Agr. Biol. Chem.**, v. 40, n. 3, p. 567-575. 1976.

SUTHERLAND, I.W. **Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides**. Cambridge University Press, 1990.163 p.

SWINGS, J. & DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-46. 1977.

VIGANTS, A., KRUCE, R. et al. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019. 1998.

VIGANTS, A., BEKERS, M. et al. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 147-150. 2000.

VIIKARI, L., GISLER, R. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 240-244. 1986.

VIIKARI, L. Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas* . **Critical reviews in biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 237-261. 1988.

YUN, W. Y. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application.
Enzyme and Microbiology Technology, v. 19, p. 107-117. 1996.