



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DA
SACCHAROMYCES CEREVISIAE E DE OUTROS FUNGOS
PRODUTORES DE OLIGOSSACÁRIDOS**

MARIA MANUELA DE LEMOS MOIO

ORIENTADOR:

PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MARIA DOS SANTOS ARTEIRO

ÉVORA 2009



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DA
SACCHAROMYCES CEREVISIAE E DE OUTROS FUNGOS
PRODUTORES DE OLIGOSSACÁRIDOS**

MARIA MANUELA DE LEMOS MOIO

**ORIENTADOR:
PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MARIA DOS SANTOS ARTEIRO**



271346

ÉVORA 2009

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Santos Arteiro, orientador científico da minha dissertação, pelo apoio científico e disponibilidade que sempre teve desde o primeiro ao último momento da realização deste trabalho.

Às Professoras Doutoradas Ana Teresa Caldeira e Maria do Rosário Martins por toda a disponibilidade e apoio demonstrados na resolução dos problemas referentes ao desenrolar do trabalho experimental.

À Dra. Fátima Pinto pela ajuda no trabalho experimental.

À Assistente Técnica no Laboratório de Biotecnologia, Maria Helena Carvalho, pela imprescindível ajuda e imensa paciência.

Aos meus pais, Antónia e Manuel, pelo apoio incondicional e compreensão demonstrados ao longo destes anos.

Resumo

Este estudo envolve o controlo e a optimização das condições de culturas dos microrganismos: *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396, *S. cerevisiae* v. lab., *Aspergillus oryzae* CCMI 125, *Aspergillus japonicus* CCMI 443, *Fusarium oxysporum* CCMI 866, *Aspergillus niger* CCMI 296 com vista à produção de oligossacáridos.

Determinaram-se os parâmetros característicos das culturas de duas diferentes estirpes de *Saccharomyces* com diferentes fontes de carbono e em diferentes condições ambientais. O perfil de crescimento da *S. cerevisiae* CCMI 396 foi semelhante nos diferentes meios de cultura estudados, sendo a velocidade específica de crescimento mais elevada no meio com glucose a pH 5 e a 30°C ($0,36h^{-1}$). A *S. cerevisiae* v. lab. teve velocidade específica de crescimento idêntica nas mesmas condições da outra estirpe, no entanto, o perfil de crescimento foi diferente nos outros meios de cultura.

Estudou-se o efeito da adição de sumo de laranja ou de tomate ao meio de cultura com sacarose e avaliou-se a evolução glucídica no meio de cultura durante o ensaio por HPLC com detector RI. Determinou-se a frutossiltransferase no sobrenadante e na fracção intracelular e determinou-se a evolução dos oligossacáridos.

Numa segunda parte deste trabalho efectuaram-se culturas dos quatro fungos filamentosos com vista a avaliar a capacidade de produção, nomeadamente, de fruto-oligossacáridos. Os resultados mostraram que a espécie *Aspergillus japonicus* CCMI 443 originou, nas mesmas condições de cultura, valores superiores, sendo a percentagem de produção $FOS_{\text{totais}}/Gluc_{\text{totais}}$ de 61% para os enzimas intracelulares e 40% para os enzimas no sobrenadante.

Optimization of culture conditions for *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi producing oligosaccharides

Abstract

This study involves control and optimization of the cultures of microorganisms: *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396, *S. cerevisiae* v. lab., *Aspergillus oryzae* CCMI 125, *Aspergillus japonicus* CCMI 443, *Fusarium oxysporum* CCMI 866, *Aspergillus niger* CCMI 296 for oligosaccharides production.

Were determined the parameters characteristic of the cultures of two different strains of *Saccharomyces* with different sources of carbon and in different environmental conditions. The growth profile of *S. cerevisiae* CCMI 396 was similar in different cultures media, but the highest specific growth was obtained in a medium with glucose, pH 5, at 30°C (0.36h⁻¹). *S. cerevisiae* v. lab. had similar growth profile in a medium with glucose but with others culture media was different.

We studied the effect of adding orange juice or tomato to the culture medium with sucrose and evaluated the evolution glucidic in the culture medium during the test by HPLC with RI detector.

Fructosyltransferase was determined in the extracellular and the intracellular fractions and determined the evolution of oligosaccharides.

In the second part of this work were carried out cultures of four filamentous fungi in order to assess production capacity, in particular, fructoligosaccharides. The results showed that the specie *Aspergillus japonicus* CCMI 443 originated in the same culture conditions, higher values and the percentage of production FOS_{total}/Guc_{total} of 61% for intracellular enzymes and 40% for extracellular enzymes.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE GERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	XV
1.Nota Prévia.....	1
2.Introdução.....	4
2.1.Breve história sobre a utilização da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2.Transformação de farinha em pão.....	9
2.3.Caracterização morfológica da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.4.Meios e condições de cultura.....	15
2.4.1.Selecção do microrganismo.....	15
2.4.2.Escolha de nutrientes do meio de cultura.....	15
2.4.3.Formulação do meio de cultura.....	17
2.4.4.Temperatura.....	17

2.4.5.pH.....	18
2.4.6.Oxigénio.....	18
2.4.7.Biorreactor.....	20
2.4.8.Modelação da fermentação: estimulação de parâmetros.....	23
2.4.8.1.Equações de balanço.....	26
2.4.8.2.Estimação dos parâmetros μ_m e K_S	27
2.4.8.3.Estimação de $Y'_{X/S}$, m_s , $Y_{P/S}$	27
2.5.Metabolismo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.5.1.Glicólise.....	29
2.5.2.Condições aeróbias.....	35
2.5.2.1.Ciclo de Krebs.....	35
2.5.2.2.Cadeia Respiratória.....	36
2.5.3.Condições anaeróbias.....	37
2.5.4.Vias metabólicas alternativas à oxidação de glucose.....	40
3.Fruto-oligossacáridos.....	45
3.1.Produção de fruto-oligossacáridos.....	45
3.2.Enzimas característicos.....	46
3.3.Microrganismos produtores de frutossiltransferase.....	48
3.4.A biomassa e o processo de produção de frutossiltransferase.....	50
3.4.1.Processo com erlenmeyers agitados.....	50
3.4.2.Produção de frutossiltransferase em biorreactor.....	53
3.4.3.Considerações e tendências futuras.....	54

4. Metodologia.....	56
4.1. Microrganismos.....	56
4.2. Estirpes <i>S. cerevisiae</i>	57
4.2.1. Meio de cultura utilizado na caracterização das estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	57
4.2.2. Meio de cultura utilizado na avaliação de glúcidos pelas estirpes de <i>Saccharomyces</i>	59
4.3. Estirpes fúngicas.....	59
4.3.1. Crescimento de culturas.....	59
4.3.2. Preparação de amostras.....	59
4.4. Métodos analíticos.....	60
4.4.1. Métodos analíticos utilizados no trabalho com as estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	60
4.4.1.1. Leitura da absorvância.....	60
4.4.1.2. Determinação da concentração em biomassa.....	60
4.4.1.3. Determinação da taxa de crescimento específica.....	61
4.4.1.4. Quantificação de Glucose.....	61
4.4.1.5. Avaliação ao longo do tempo dos glúcidos e dos fruto-oligossacáridos produzidos pelas estirpes de <i>Saccharomyces</i>	62
4.4.1.6. Determinação do enzima frutossiltransferase.....	62
4.4.2. Métodos analíticos utilizados no trabalho desenvolvido com as e. fúngicas.....	63
4.4.2.1. Ensaio enzimático da frutofuranosidase / Produção de FOS.....	63
4.4.2.2. Separação dos açúcares por TLC.....	64
4.4.2.3. Quantificação da glucose através de um kit enzimático.....	65
4.4.2.4. Quantificação da produção de FOS (1-Cestose e Nistose) e dos açúcares residuais (Sacarose, Glucose e Frutose) por HPLC.....	64

5.Resultados e Tratamento de Resultados.....	65
5.1.Caracterização de duas estirpes de <i>Saccharomyces</i> , variando a fonte de carbono, a temperatura e o pH.....	65
5.1.1.Estirpe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCMI 396.....	66
5.1.2.Estirpe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v. lab.....	67
5.2.Determinação da concentração em biomassa, em sacarose 20% suplementada com resíduos agro-industriais, mantendo a temperatura e o pH.....	69
5.3.Cultura em biorreactor da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com sumo de Laranja, à temperatura 30° e pH=5.....	70
5.4.Avaliação ao longo do tempo dos glúcidos e dos fruto-oligossacáridos produzidos pelas estirpes de <i>Saccharomyces</i>	72
5.5.Cultura de fungos filamentosos e avaliação da acção do enzima FFase na produção de fruto-oligossacáridos a partir de sacarose.....	75
5.5.1.Morfologia das células fúngicas.....	75
5.5.2.Separação de glúcidos por TLC.....	77
5.5.3.Quantificação da actividade enzimática e da produção de FOS.....	78
6.Considerações finais.....	85
7.Referências bibliográficas.....	87
ANEXOS.....	94
ANEXO A.....	95
ANEXO B.....	108
ANEXO C.....	112

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos
produtores de oligossacáridos

ANEXO D.....113

ANEXO E.....118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Pintura egípcia descrevendo todo o processo de fabrico do pão.....	4
Figura 2.2 – Padaria egípcia, escultura em madeira datada do ano 1975 a.C., encontrada num túmulo de Meketre.....	5
Figura 2.3 – Fabrico do pão, escultura em madeira encontrada num túmulo egípcio.....	5
Figura 2.4 – Pintura do interior de um túmulo egípcio, ilustra o processo de fabricação do pão, observando-se o pão com forma circular e oval.....	6
Figura 2.5 – Fabrico do pão na Grécia Antiga.....	7
Figura 2.6 – Padaria descoberta na cidade de Pompeia.....	7
Figura 2.7 – Estrutura celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com dimensões.....	11
Figura 2.8 – Estrutura celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , imagem obtida utilizando microscópio de transmissão electrónica.....	12
Figura 2.9 – Observação do crescimento vegetativo.....	13
Figura 2.10 – Cicatrizes devidas às separações dos brotos.....	13
Figura 2.11 – Reprodução sexual da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figura 2.12 – Gradientes de concentração no filme de gás e no filme de líquido na transferência do oxigénio de bolhas de ar para o meio de cultura.....	18
Figura 2.13 – Perfis de concentração de oxigénio dissolvido durante a aplicação do método dinâmico.....	19
Figura 2.14 – Fosforilação da glucose.....	30
Figura 2.15 – Isomerização da glucose seguida da fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-difosfato.....	31
Figura 2.16 – Cisão da frutose-1,6-difosfato e posterior cisão nos isómeros interconvertíveis.....	32
Figura 2.17 – Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato.....	32
Figura 2.18 – Hidrólise do ácido difosfoglicérico.....	33

Figura 2.19 – Reacções finais de Glicólise.....	33
Figura 2.20 – Esquema global da Glicólise.....	34
Figura 2.21 – Principais etapas do Ciclo de Krebs.....	36
Figura 2.22 – Cadeia de transporte de electrões.....	37
Figura 2.23 – Fermentação alcoólica.....	38
Figura 2.24 – Constituição do centro activo do enzima Y A DH-1.....	39
Figura 2.25 – Glucose-6-fosfato.....	40
Figura 2.26 – Hidrólise do 6-fosfoglucono- δ -lactona.....	41
Figura 2.27 – Transformação do 6-fosfogluconato em ribulose-5-fosfato.....	41
Figura 2.28 – Isomerização da ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato.....	42
Figura 2.29 – Reaproveitamento da ribose-5-fosfato.....	43
Figura 2.30 – Relação entre as vias Glicólise e Pentoses-fosfato.....	44
Figura 3.1 – Estrutura química dos principais fruto-oligossacáridos.....	47
Figura 5.1 - Perfil da curva logarítmica de crescimento obtida para <i>S. cerevisiae</i> CCMI 396 em meio de cultura contendo glucose, à temperatura de 30 °C e a pH = 5.....	66
Figura 5.2 – Perfil de crescimento obtido e o perfil de consumo de glucose para a <i>S. cerevisiae</i> 396, a 30 °C e pH =5.....	67
Figura 5.3 - Perfil da curva de crescimento obtida para <i>S. cerevisiae</i> v. lab. em meio de cultura contendo glucose, à temperatura de 30 °C e a pH = 5.....	68
Figura 5.4 – Perfil das curvas de crescimento da <i>S. crevisiae</i> v. lab., e de consumo de glucose, a 30°C e pH=5.....	68
Figura 5.5 – Perfil da curva lagarítmica do crescimento <i>S. c.</i> CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com 80% de laranja.....	71
Figura 5.6 - Perfil da curva ldo crescimento da <i>S. c.</i> CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com 80% de laranja.....	71
Figura 5.7 – Curva de Calibração Padrão da Nistose.....	72
Figura 5.8 – Cromatograma da Glucose, Frutose, Sacarose, Nistose e 1-Cestose.....	72

Figura 5.9 – Cromatograma referente à cultura em meio de sacarose 20% e 80% Sumo de tomate com tempo de cultura de 7 horas.....	73
Figura 5.10 – Concentração de frutose, glucose e sacarose em função do tempo, existente na cultura em meio de sacarose 20% e 80% Sumo de tomate.....	73
Figura 5.11 – Determinação de FTase na cultura de <i>s. cerevisiae</i> 396 em sacarose 20% e tempo de cultura de 10h.....	74
Figura 5.12 – Concentração de açúcar em função do tempo de cultura para <i>S. cerevisiae</i> 396 em sacarose 20% e água.....	74
Figura 5.13 – Culturas de fúngicas.....	76
Figura 5.14 – Cromatogramas obtidos. A- Padrões; B- Amostras dos sobrenadantes das culturas fúngicas; C- Amostras dos extractos intracelulares das quatro estirpes fúngicas.	77
Figura 5.15 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de sobrenadante da estirpe de <i>Aspergillus japonicus</i> CCMI 443.....	79
Figura 5.16 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de extracto intracelular da estirpe de <i>Aspergillus japonicus</i> CCMI 443.....	79
Figura 5.17 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de sobrenadante da estirpe de <i>Aspergillus niger</i> (296)	80
Figura 5.18 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de extracto intracelular da estirpe de <i>Aspergillus niger</i> (296).....	80
Figura 5.19 - Variação da percentagem de FOS ao longo do tempo de reacção do ensaio da FFase, para as amostras de sobrenadante e extracto intracelular da estirpe <i>Aspergillus japonicus</i> (443) numa cultura de 7 dias.....	81
Figura 5.20 - Variação da percentagem de FOS ao longo do tempo de reacção do ensaio da FFase, para as amostras de sobrenadante e extracto intracelular da estirpe <i>Aspergillus niger</i> (296) numa cultura de 7 dias.....	81
Figura 5.21 - Quantidade de FOS existentes em relação aos glúcidos totais para os ensaios enzimáticos da FFase do sobrenadante da cultura ao sétimo dia com <i>Aspergillus japonicus</i> CCMI 443.	82
Figura 5.22 - Percentagem dos FOS totais da acção enzimática da amostra do sobrenadante e do extracto intracelular referente à estirpe <i>A. niger</i> em relação aos glúcidos totais das respectivas amostras.....	82

Figura 5.23 - Variação da actividade enzimática medida pela quantidade de glucose produzida com o sobrenadante da amostra da estirpe *Aspergillus japonicus* CCMI 443 recolhida no sétimo dia de cultura no ensaio enzimático com sacarose a 20%..... 83

Figura 5.24 - Variação da actividade enzimática medida pela quantidade de glucose produzida com o sobrenadante da amostra da estirpe *Aspergillus niger* CCMI 296 recolhida no sétimo dia de cultura no ensaio enzimático com sacarose a 20%..... 84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição elementar do fermento de padeiro.....	16
Tabela 2.2 – Variáveis e respectivas unidades.....	27
Tabela 3.1 – Resumo de estudos de produção de FTase por diferentes microrganismos.....	49
Tabela 4.1 – Composição do meio de cultura (adaptado de Yuan, J.Q. et al, 1993).....	58
Tabela 4.2 - Preparação de um litro de meio de cultura.....	58
Tabela 4.3 – Constituição de meios (Cerqueira, 2005 e Dorta, C e tal, 2006).....	59
Tabela 4.4 – Preparação de soluções-padrão.....	62
Tabela 5.1 – Fontes de carbono e condições ambientais experimentadas.....	65
Tabela 5.2 - Velocidade específica de crescimento das estirpes estudadas em sacarose 20% suplementada com sumo de laranja e sumo de tomate.....	69
Tabela 5.3 – Dados de produtividade obtidos nas culturas das estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos meios de cultura suplementados com sumo de laranja e sumo de tomate.....	70
Tabela 5.4 – Quantificação da actividade enzimática pela medição da glucose, medida por Kit enzimático, produzida por acção do enzima FTase sobre a sacarose.....	78

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

FFase	B-D-Fructofuranosidase
FTase	Frutossiltransferase
FOS	fruto-oligossacáridos
GF2	1-Cestose
GF3	Nistose
GF4	Fructofuranosil nistose
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLC	Cromatografia de camada fina

1. Nota Prévia

O conhecimento actual sobre *Saccharomyces cerevisiae* atingiu níveis científicos elevados, foi o primeiro organismo a ter o seu genoma totalmente sequenciado, o que fez dele o organismo mais estudado, utilizado e divulgado. Assim foi interessante visitá-lo na história. Isso levou ao registo de alguns testemunhos que são úteis para motivar o estudo desta área científica e conhecer a beleza de como este saber foi transmitido.

É uma levedura ligada ao progresso e bem-estar da humanidade. Algumas espécies do género *Saccharomyces* são capazes de realizar o processo de fermentação, processo este que desde tempos ancestrais tem sido explorado na fabricação de pão e bebidas alcoólicas, e tem sido escolhida como modelo básico de célula biológica para o estudo de processos complexos.

O desempenho da levedura é afectado pela estirpe seleccionada, meios de cultura utilizados, pH, temperatura, oxigénio e outros factores ambientais. A utilização de erlenmeyers agitados e biorreactores para a cultura da *S. cerevisiae* permitiram utilizar processos fermentativos para determinar a velocidade específica de crescimento, o rendimento em biomassa, bem como a actividade fermentativa do microrganismo.

O estudo do metabolismo permitiu conhecer os produtos primários e secundários, e os factores ambientais que influenciavam a sua formação. As reacções enzimáticas envolvidas e as características cinéticas conduziram ao início do estudo sobre a regulação de determinadas vias metabólicas.

O desenvolvimento deste estudo e a necessidade de aplicações úteis desta informação, levaram à realização experimental da fermentação e ao conhecimento dos parâmetros do processo e dos produtos que se poderão obter.

Assim, neste trabalho, estudou-se o perfil de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em cultura descontínua, em erlenmeyers agitados e em biorreactor, utilizando diversas fontes de carbono e de azoto e em diferentes condições ambientais. Este estudo foi acompanhado com a medida de parâmetros que permitiram planear acções de fermentação futuras.

No sentido de conhecer o comportamento de duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* em meios de cultura com sacarose, suplementada com sumo, realizaram-se vários ensaios experimentais e controlou-se a evolução do conteúdo desses meios de cultura.

Este estudo tentou verificar se estas estirpes de *Saccharomyces* utilizadas em condições de concentração elevada de sacarose originavam fruto-oligossacáridos, FOS. Desenvolvem-se as culturas e as técnicas necessárias para seguir o consumo da sacarose e determinar possíveis compostos resultantes das transformações da sacarose pela *Saccharomyces cerevisiae* em oligómeros de frutose tais como os compostos de 1-cestose (GF₂), nistose (GF₃) e frutofuranosil nistose (GF₄), em que as unidades de frutossil (F) são ligadas à sacarose com uma ligação beta-2,1.

Construíram-se curvas de calibração com padrões destes compostos por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, com detector de índice de refração para detectar os FOS nas culturas desenvolvidas. Como nestas culturas não foram detectados estes compostos considerou-se importante utilizar outros microrganismos que a bibliografia recomendava para os obter. Tinham-se já desenvolvido as técnicas necessárias para o efeito e considerou-se pertinente levar a efeito novas culturas. Era importante estudar esta área científica como também, sendo professora, a aplicar na prática lectiva. Deste modo, criaram-se as bases para o início do trabalho de investigação futura.

Assim, considera-se que o objectivo a atingir, que consistia na preparação científica e profissional, foi alcançado. Desenvolveram-se metodologias de trabalho, efectuaram-se culturas de microrganismos em condições de rigor científico, aplicaram-se as técnicas analíticas ao controlo dos processos biotecnológicos e efectuou-se pesquisa bibliográfica. Consolidou-se o saber para a investigação científica e o ensino no futuro.

O trabalho desenvolveu-se em duas partes: uma teórica, outra experimental.

A parte teórica compreende os seguintes capítulos: uma breve história sobre as leveduras; a caracterização da *Saccharomyces cerevisiae*; factores que condicionam o crescimento; metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de fruto-oligossacáridos.

A parte experimental está dividida em quatro partes: o controlo do crescimento de duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* em diversos meios de cultura em

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

erlenmeyers agitados; culturas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura com sacarose suplementado com sumo de laranja e de tomate; cultura de meio otimizado em biorreactor e culturas de quatro fungos filamentosos produtores de fruto-oligossacáridos, *Aspergillus oryzae* CCMI 125, *Aspergillus japonicus* CCMI 443, *Fusarium oxysporum* CCMI 866 e *Aspergillus niger* CCMI 296.

2.Introdução

2.1. Breve história sobre a utilização da *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura está intimamente ligada à História através da fabricação do pão e das bebidas fermentadas.

Há hieróglifos egípcios com mais de 5000 anos que sugerem a utilização da levedura no fabrico do pão e de cerveja.

Embora não se conheça com exactidão quando começou o fabrico do pão, há achados arqueológicos relativos à trituração de grão que apontam os Períodos Mesolítico o Neolítico como o início dessa actividade.

O pão para além de alimento também era utilizado como oferenda aos deuses.

No Antigo Egipto o pão servia, por vezes, de salário. Nesta civilização, este alimento era tão importante que o seu fabrico ficou retratado em pinturas, esculturas em madeira e nas pinturas das paredes dos túmulos reais, como se pode ver nas seguintes figuras (Figura 2.1. a 2.4.).



Figura 2.1 - Pintura egípcia descrevendo todo o processo de fabrico do pão.
(<http://www.themediadrone.com/food.html>)



Figura 2.2 – Padaria egípcia, escultura em madeira datada do ano 1975 a.C., encontrada num túmulo de Meketre (Metropolitan Museum of Art)



Figura 2.3 – Fabrico do pão, escultura em madeira encontrada num túmulo egípcio (www.ancientegypt.co.uk/life/explore/babr1.html)

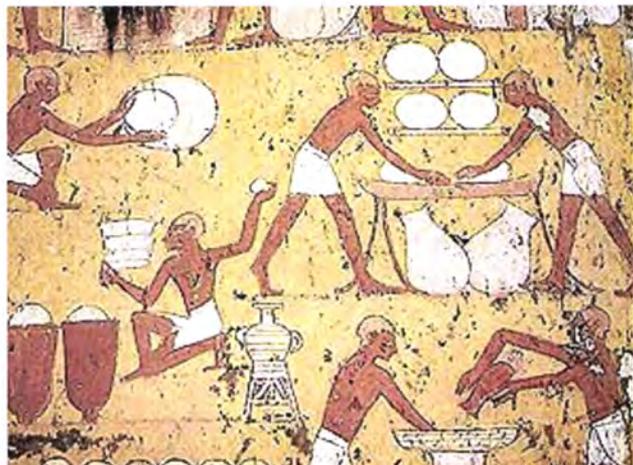


Figura 2.4 – Pintura do interior de um túmulo egípcio, ilustra o processo de fabricação do pão, observando-se o pão com forma circular e oval (Jacob, H. E. 2003).

O pão levedado e não levedado é também referenciado em vários textos da Bíblia, por exemplo:

«Abraão foi, sem perda de tempo, à tenda onde se encontrava Sara, e disse-lhe: “Depressa, amassa já 3 medidas de flor de farinha e coze uns pães no borralho.”»

Gen. 18:6

Ou

«O povo levou a sua massa ainda por levedar, e embrulhando nas capas as escudelas que a continham, colocaram-nas aos ombros»

Exo. 12:34

Na Grécia Antiga, o pão é, também, confeccionado desde o ano 250 a.C., mas os Gregos enriqueceram as receitas egípcias do fabrico do pão com ervas ou grãos aromatizantes. A Figura 2.5 ilustra a importância desta actividade, observando-se um tocador que acompanha todo o trabalho.



Figura 2.5 – Fabrico do pão na Grécia Antiga (<http://www.mlahanas.de/Greeks/GreekLife.htm>)

Os Romanos souberam aproveitar toda a influência da cultura helenística, e o fabrico do pão não foi excepção.

Em Pompeia, cidade colonizada pelos romanos e sepultada por magna ardente devido à erupção do Vulcão Vesúvio, no dia 24 de Agosto do ano 79 depois de Cristo, existia, como escavações arqueológicas o demonstraram, uma rua só com padarias, Figura 2.6.



Figura 2.6 – Padaria descoberta na cidade de Pompeia (www.flickr.com)

Esta civilização foi responsável pelos melhoramentos de moagem do grão e pela criação da primeira escola de padeiros.

Estes ensinamentos foram transmitidos pelas legiões romanas aos Gauleses.

Desde então, o pão foi descoberto por diversos povos, devido às trocas comerciais e colonizações, tornando-se a base da alimentação da maior parte da Humanidade, devendo-se referir que as técnicas de panificação foram evoluindo ao longo dos séculos mas a utilização do isco - porção de massa da fabricação precedente - foi uma constante até ao início do século XIX.

Como foi referido, a levedura é utilizada desde à vários séculos no fabrico de pão e de bebidas alcoólicas, contudo só em meados do século XIX, o químico Louis Pasteur descobriu que a fermentação se deve à acção de microrganismos que, quando privados de oxigénio, convertem o açúcar em etanol e dióxido de carbono. No entanto, já em 1680 Antoni van Leeuwenhoek tinha observado as células de levedura, existentes numa gota de cerveja fermentada ao microscópio (Lima, N. et al. 2003).

Depois destes pequenos e importantes passos, outros foram dados, como por exemplo:

- utilização do nome *Saccharomyces cerevisiae* para designar leveduras observadas no malte;
- produção industrial de levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- identificação do açúcar como nutriente para o crescimento da levedura;
- implementação de cultura asséptica de leveduras;
- utilização de sistemas de controlo – eléctrodos de pH e de oxigénio;
- primeiro mapa genético da *Saccharomyces cerevisiae*;
- produção industrial de levedura prensada, por Fleischmann em 1968;
- produção da vacina da hepatite B, utilizando-se para o efeito células de *Saccharomyces cerevisiae* com o DNA recombinado.

Até que em 1996 foi disponibilizada a sequência completa do genoma desta levedura, abrindo-se outras frentes de utilização deste microrganismo.

Assim, pode-se afirmar que as capacidades metabólicas da levedura são exploradas pelo Homem desde há vários séculos, embora só com recentes avanços

científicos e tecnológicos tenha sido possível otimizar e diversificar essa exploração nas diferentes áreas da chamada biotecnologia (Alcarde, A.R. et al., 1997).

2.2. Transformação de farinha em pão

As massas utilizadas na panificação são constituídas essencialmente por farinha, sal, água e levedura.

Como já foi referido, o microrganismo responsável pela fermentação desta mistura é a *Saccharomyces cerevisiae*, vulgarmente conhecida como a levedura de padreiro.

A fermentação depende da disponibilidade de açúcares presentes na farinha e da capacidade enzimática das α e β -amilases que catalisam a transformação do amido em dextrinas e posteriormente em maltose.

Como as proteínas na massa são enzimas glicolíticas, um elevado conteúdo proteico resulta numa elevada actividade fermentativa (Enfors, S-O, et al., 1990)

Mas a actividade fermentativa também está dependente do estado fisiológico das células, devendo toda a cultura apresentar o mesmo estado de maturação, com reduzido número de gemulações (Fonseca, M. e Teixeira, J. 2006).

Os açúcares mais simples glucose, frutose e sacarose asseguram a parte inicial da fermentação cabendo à maltose a continuação da fermentação, cada molécula de maltose é decomposta duas moléculas de glucose e frutose através da acção catalítica da α -glucosidase. *Saccharomyces cerevisiae* não fermenta directamente a sacarose mas, a sua enzima invertase permite a decomposição do dissacárido em glucose e frutose.

O sal, composto com função antifúngica, é outro factor limitante da actividade fermentativa, para concentrações entre 2% e 2,5 % p/p existe inibição considerável da fermentação.

A temperatura e a presença de oxigénio também devem ser controladas, a temperatura deve variar, durante a fermentação, entre os 25 °C e os 30 °C e a concentração de oxigénio na massa deve ser reduzida ou seja a fermentação deve

decorrer em ambiente microaerofílico, permitindo assim que a massa aumente quatro a cinco vezes o volume. (Lima, N., 2003)

O pão é o produto resultante da cozedura de massa de farinha levedada. Levedar significa aumentar de volume, com conseqüente abaixamento de densidade; tal é provocado pela produção in situ de dióxido de carbono, o qual fica retido na matriz do glúten e se expande durante a cozedura, dando origem à formação de espaços vazios. O glúten é a proteína funcional da farinha de trigo, a qual possui a propriedade de, quando húmida e mecanicamente trabalhada, ganhar elasticidade, permitindo, deste modo, a expansão contida e a posterior libertação do gás nela aprisionado. (Lima, N. e outro, 2003).

A cozedura da massa decorre a altas temperaturas, matando a levedura e evaporando o etanol e a água. O amido ainda existente gelatiniza e o glúten precipita, adquirindo o pão uma estrutura semi-rígida.

O etanol produzido pela levedura embora evapore dá origem à formação de ésteres, os quais conferem qualidade ao pão, nomeadamente sabor.

As propriedades importantes que uma levedura deve possuir para uma fermentação rápida da massa são:

- elevada actividade glicolítica;
- capacidade de adaptação rápida à alteração de substratos;
- elevada actividade da invertase;
- elevado potencial de fermentação da maltose;
- capacidade de sintetizar enzimas e coenzimas em condições anaeróbicas. (Oda, Y. et al. 1989)

2.3. Caracterização morfológica da *Saccharomyces cerevisiae*

Levedura é um nome genérico que agrupa tanto espécies patogénicas para animais e plantas como espécies não patogénicas e muito úteis.

As leveduras, de acordo com a taxonomia proposta em 1969 por Robert Whittaker, são seres eucariotas pertencentes ao Reino Fungi. A *Saccharomyces cerevisiae* inclui-se na classe Ascomycota e no género *Saccharomyces*. (Pelczar *et al.* 1993; Prescott *et al.* 1999)

As leveduras constituem um grupo de microrganismos que está intimamente ligado ao progresso e bem-estar da humanidade, algumas espécies do género *Saccharomyces* são capazes de realizarem o processo de fermentação, processo este que desde tempos ancestrais tem sido explorado na fabricação de pão e bebidas alcoólicas.

De entre as leveduras destaca-se o microrganismo denominado *Saccharomyces cerevisiae* também conhecido como fermento de padreiro, é um ser unicelular, de dimensões reduzidas, sendo bem conhecida a sua fisiologia e processos bioquímicos.

Este conhecimento permitiu que fosse escolhido como modelo básico de célula biológica para o estudo de processos complexos. (Dujon, B., 1996).

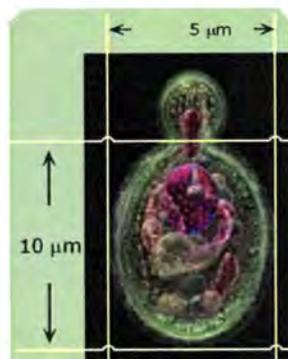


Figura 2.7 – Estrutura celular da *Saccharomyces cerevisiae*, com dimensões (adaptado de www.wdv.com/CellWorld/Yeast/index.htm acessível em 30/8/2007)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro eucariota a ter o seu genoma totalmente sequenciado. André Goffeau e mais de 600 investigadores oriundos de vários países anunciaram a 24 de Abril de 1996 esta descoberta, afirmando que uma célula haplóide possui 16 cromossomas variando o seu tamanho de 200 a 2200 kDa e possui 6340 genes (André Goffeau *et al.* 1996). As células desta levedura têm forma

esférica, elipsoidal ou cilíndrica variando a sua largura entre 4 - 8 μm e o seu comprimento entre 5 - 16 μm , Figura 2.7 (Reed et al. 1973).

Como ser eucariota, a *Saccharomyces cerevisiae* possui um elevado grau de organização, possuindo um núcleo limitado por uma membrana celular e vários organelos como mitocôndria, vacúolo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, Figura 2.8.

A parede celular deste microrganismo é constituída por glucano, manosana e proteínas, as quais contêm uma pequena quantidade de quitina (Hartwell, 1974).

As mitocôndrias são responsáveis pelo metabolismo energético celular e nos vacúolos armazenam-se nutrientes e produtos tóxicos.



Figura 2.8 – Estrutura celular da *Saccharomyces cerevisiae*, imagem obtida utilizando microscópio de transmissão electrónica (www.jhu.edu/iic/yeast-1.htm acessível em 30/8/2007)

Este microrganismo pode reproduzir-se de forma assexuada e sexuada. Em condições favoráveis, a forma diplóide da levedura divide-se por mitose e gera células idênticas a si própria. Este processo denomina-se gemulação ou brotamento, durante o qual a célula-mãe produz um broto que vai crescendo durante o ciclo, até que este se separa da célula progenitora, Figura 2.9. A célula-filha no momento da separação é mais pequena que a célula progenitora mas posteriormente atinge o tamanho característico da sua estirpe e está pronta para sofrer o processo de gemulação (Ratledge, 1990).

O crescimento do broto funciona como um indicador morfológico do progresso do ciclo celular, permitindo afirmar que o ciclo completo de crescimento de uma célula

diplóide à temperatura de 30 °C e em condições favoráveis demora cerca de 100 minutos, mas a duração do ciclo depende das condições da cultura (Hartwell, 1974).

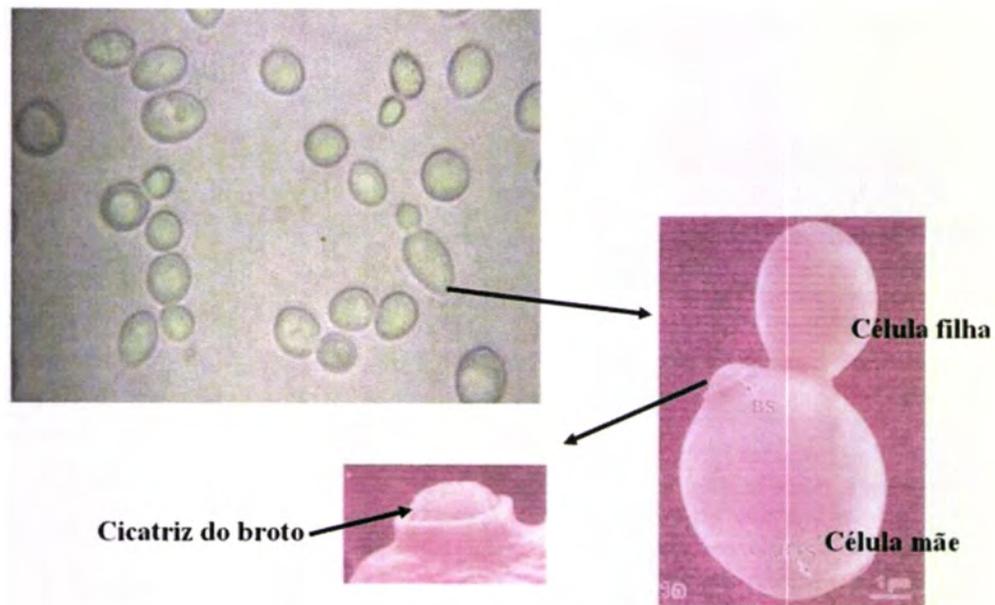


Figura 2.9 – Observação do crescimento vegetativo.

(www.microbiologybytes.com/video/Scerevisiae.html, acessível em 30/8/2007)

Quando o broto se separa da célula-mãe, verifica-se a existência de uma cicatriz permanente nas células mãe e filha Fig. 2.9 (Cabib et al. 1971; Hartwell 1974).

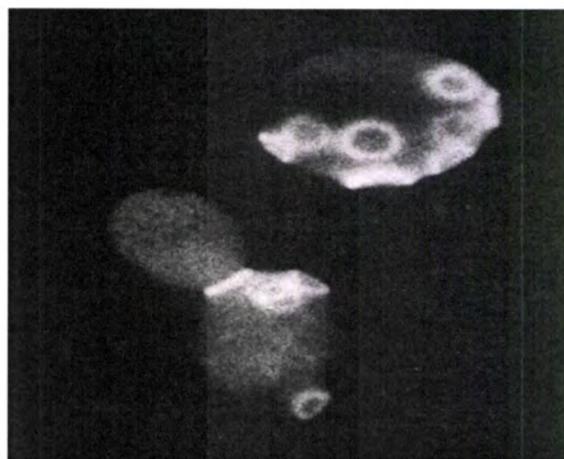


Figura 2.10 – Cicatrizes devidas às separações dos brotos. (Hartwell, 1974)

Mas em condições adversas (como insuficiência de nutrientes, ausência prolongada de água e variações de temperatura) a forma diplóide da levedura origina um asco, estrutura que contém normalmente quatro esporos, células haplóides.

Os esporos são formas de resistência que “germinam” em presença de humidade dando origem a células haplóides e diplóides. As células haplóides contêm apenas uma cópia dos cromossomas parentais, podendo o mesmo ser do tipo sexual a ou α , que são originadas pelo processo de divisão meiótica. As células diplóides são originadas pela fusão de células haplóides de tipos sexuais diferentes, com é ilustrado na fig. 2.11.

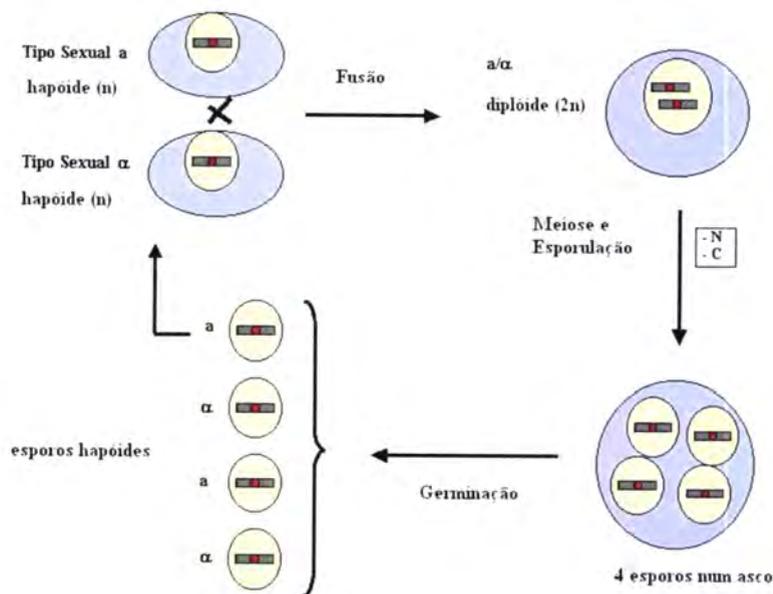


Figura 2.11 – Reprodução sexual da *Saccharomyces cerevisiae*. (adaptado de www.microbiologybytes.com/video/Scerevisiae.html, acessível em 30/8/2007)

De forma semelhante às plantas, a levedura *Saccharomyces* tem parede celular rígida e também um vacúolo no citoplasma, o qual pode acumular água e, assim, alterar o volume da célula. Por esta razão, estas células podem aumentar ou diminuir de volume e até mesmo perder toda a água sem perda de viabilidade. O material genético está organizado, no núcleo destas células, em 16 cromossomas, que podem ser visualizados através de electroforese em gel.

Quanto à categoria nutricional é considerado um organismo quimiorganoheterotrófico.

2.4.Factores que condicionam o crescimento do microrganismo

Os microrganismos são os seres preferencialmente escolhidos para integrarem vários processos biotecnológicos devido a:

- serem seres unicelulares ou pluricelulares mas pouco diferenciados facilitando a sua cultura em fermentadores;
- apresentarem elevada velocidade de metabolismo;
- possuírem a capacidade de converter compostos de diferentes tipos;
- permitirem obter grande diversidade de metabolitos quer primários quer secundários.

As fases típicas de um processo de biotecnologia microbiana, antes da operação do biorreactor propriamente dito e do que se passa a jusante deste, envolvem a selecção do microrganismo mais conveniente, a caracterização detalhada do microrganismo seleccionado, tendo em vista a escolha adequada dos nutrientes, a formulação do meio de cultura em função da matéria-prima disponível e a definição das outras condições (parâmetros físico-químicos) de fermentação. (Alcarde, A.R., Basso, L.C., 1997).

2.4.1.Selecção do microrganismo

A selecção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* a utilizar em processos fermentativos está dependente da análise da taxa específica de crescimento, rendimento em biomassa bem como da actividade fermentativa do microrganismo.

2.4.2.Escolha de nutrientes do meio de cultura

Industrialmente a *Saccharomyces cerevisiae* é produzida em meios de cultura que contêm melaços de cana-de-açúcar e de beterraba, ricos em sacarose. Esta levedura não utiliza directamente este açúcar sendo necessário que o enzima invertase transforme este açúcar em glucose e frutose.

Os melaços são deficientes em fósforo e azoto pelo que estes compostos são habitualmente suplementados na forma de fosfato de amónio. Além do azoto e fósforo, e atendendo a que os melaços contêm apenas uma pequena fracção dos elementos essenciais ao crescimento, são ainda adicionados ao meio de cultura, na forma de sais minerais, potássio, magnésio, enxofre e cálcio (Lima, N., Mota, M., 2003).

As vitaminas são, também, essenciais ao crescimento do microrganismo, sendo necessária a inclusão de biotina, pantetonato, tiamina e inositol no meio de cultura (Kristiansen, B., 1994). Embora os melaços tenham tiamina suficiente para o crescimento óptimo da levedura, esta vitamina é frequentemente adicionada, uma vez que estimula a actividade fermentativa da levedura (Almeida, M.J. A., 1997)

A junção de quantidades vestigiais de manganês, cobalto, cobre, molibdénio, zinco e ferro é essencial porque estes elementos funcionam como cofactores de vários enzimas.

Todos estes nutrientes são incorporados no material celular, alguns participando na formação de macromoléculas e estruturas das células, outros permitem a obtenção de energia e ainda alguns que desempenham as duas funções.

O azoto é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das leveduras, este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, citocromos, e vitaminas.

Os macronutrientes nitrogénio, carbono, hidrogénio e oxigénio representam cerca de 94% da matéria seca (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Composição elementar do fermento de padeiro

(adaptado de Kristiansen, B., 1994)

Elemento	% peso seco
Carbono	48
Oxigénio	31
Nitrogénio	8
Hidrogénio	7
Potássio	2
Fósforo	1,5
Magnésio	0,3
Cálcio	0,2
Enxofre	0,2
Elementos - traço	1,8

A água também é um factor fundamental representando 80-90% do peso total das células.

2.4.3. Formulação do meio de cultura

Na sua composição, os meios de cultura deverão incluir os nutrientes indispensáveis ao organismo em causa, sob forma assimilável. Quantitativamente, os nutrientes deverão estar presentes em concentrações adequadas e não tóxicas, tais que, a carência de qualquer um deles não impeça a utilização dos demais (Ferreira, W. F et al. 1998).

A formulação óptima do meio de cultura dependerá do microrganismo e do produto pretendido.

A esterilização do meio de cultura é uma operação de extrema importância, eliminando desta forma os microrganismos contaminantes.

Alguns componentes do meio têm de ser esterilizados por filtração em virtude da temperatura a que decorre a esterilização com calor húmido alterar esses componentes.

Para a maioria dos processos de biotecnologia microbiana, o fermentador, o meio de cultura e ar fornecidos devem ser previamente esterilizados e as condições de assepsia mantidas durante a fermentação para que a qualidade do produto não seja afectada.

2.4.4. Temperatura

Após a inoculação, os meios de cultura devem ser incubados a temperaturas adequadas.

A *Saccharomyces cerevisiae* é usualmente produzida a 30°C este valor traduz o compromisso entre o valor de temperatura em que o rendimento de biomassa é máximo e em que a taxa específica de crescimento é máxima, 28,5 °C e 32,0 °C, respectivamente (Kristiansen, B., 1994).

2.4.5.pH

O pH óptimo para o crescimento situa-se entre 4 e 5,5 (Enfors, S. -O. et al., 1990).

É usual que o pH seja mantido em valores próximos de 4 durante quase todo o processo fermentativo (para minimizar o risco de contaminações) e, no final, utilizam-se valores de 5,5 para minimizar a absorção de pigmentos dos melaços, sendo a levedura produzida mais clara (Kristiansen, B. 1994). No entanto, o pH da fermentação é um factor que varia pois, condiciona o que se pretende otimizar na fermentação, a biomassa ou os produtos.

2.4.6.Oxigénio

A estabilidade da levedura é também afectada pelas condições de produção, um processo aeróbio permite maior estabilidade possuindo portanto, elevado conteúdo em hidratos de carbono e baixo em conteúdo proteico. No entanto, um baixo conteúdo proteico traduz-se em actividade fermentativa reduzida. Assim, tem que existir um compromisso entre a estabilidade e o desempenho do microrganismo (Lima, N. et al., 2003; Fonseca, M et al., 2006).

A reduzida solubilidade do oxigénio nos meios de cultura líquidos significa que a força motriz, “driving force”, para a transferência de massa é baixa, isto é, não é tarefa simples satisfazer os requisitos em oxigénio das culturas microbianas. Segundo a Teoria do filme, a maior resistência à transferência situa-se no filme de líquido, Figura 2.12.

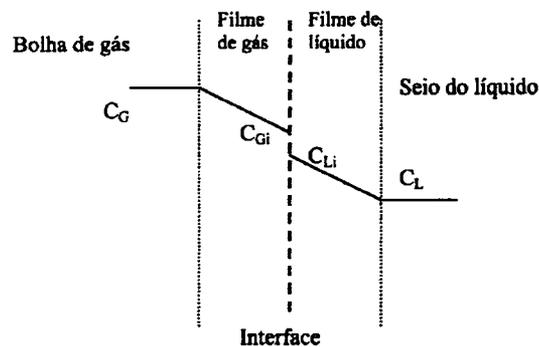


Figura 2.12 – Gradientes de concentração no filme de gás e no filme de líquido na transferência do oxigénio de bolhas de ar para o meio de cultura. (Fonseca, M. et al. 2006)

O $k_{L,a}$, coeficiente volumétrico de transferência de massa, parâmetro utilizado para caracterizar a transferência de massa gás-líquido, depende de vários factores:

- dimensões do reactor;
- potência do agitador;
- caudal de arejamento;
- viscosidade do meio de cultura;
- composição do meio de cultura;
- estrutura do microrganismo;
- agente anti-espumante utilizado;
- temperatura.

A concentração crítica de oxigénio (C_{L,O_2}) é outra grandeza importante no estudo da transferência de massa de Oxigénio. Definindo-se como a concentração de oxigénio abaixo da qual a taxa de consumo de oxigénio é afectada pela concentração de oxigénio dissolvido. Para a *Saccharomyces cerevisiae*, considerando como substrato a glucose, a concentração crítica de oxigénio e a taxa específica de consumo de oxigénio (q_{o_2}) são, 0,13 mg/L e $0,30 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Fonseca, M. et al., 2006).

Um dos métodos, utilizado na determinação de $k_{L,a}$, é o método dinâmico. Este método pode ser dividido em duas fases:

1. interrupção do arejamento e registo do decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido, o que permite calcular a taxa de consumo de oxigénio.
2. restabelecimento do fornecimento de oxigénio, antes de ser atingido o valor crítico da concentração de oxigénio.

No gráfico (Figura 2.13) identifica-se os momentos da desgaseificação e o início do arejamento.

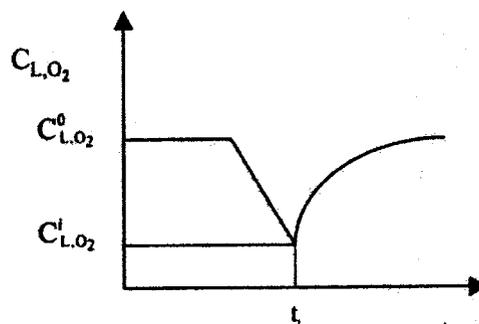


Figura 2.13 – Perfis de concentração de oxigénio dissolvido durante a aplicação do método dinâmico.

O balanço de massa de oxigénio na fase líquida é expresso na equação seguinte:

$$\frac{dC_{o_2}}{dt} = k_L a(C^*_{o_2} - C_{o_2}) - q_{o_2} X \quad (2.4.6.1)$$

Admitindo que antes da determinação o estado é pseudo-estacionário, $q_{o_2} X$ pode ser substituído por $k_L a(C^*_{o_2} - C^{\circ}_{o_2})$, a equação (2.4.6.1) é integrada, obtendo-se:

$$\ln\left(\frac{C^{\circ}_{L,o_2} - C_{L,o_2}}{C^{\circ}_{L,o_2} - C^i_{L,o_2}}\right) = -k_L a(t - t_i) \quad (2.4.6.2)$$

A representação do termo do lado esquerdo da equação (2.4.6.2), em função do tempo, origina uma recta cujo declive é $-k_L a$ (Fonseca, M. et al., 2006).

2.4.7. Biorreactor

O crescimento dos organismos num reactor biológico (ou biorreactor) decorre através do fornecimento ao meio líquido de certos nutrientes ou substratos (fontes de carbono, azoto, oxigénio, vitaminas, micronutrientes) na presença de condições ambientais favoráveis (temperatura, pH, arejamento, agitação, ...).

Historicamente o primeiro fermentador no laboratório foi o balão de Erlenmeyer com agitação.

Um reactor biológico é, portanto, um tanque onde ocorre uma ou várias reacções biológicas, geralmente em meio líquido.

A dinâmica dos processos de fermentação é consequência da cinética de crescimento dos microrganismos, da hidrodinâmica e do tipo de reactor, do modo de fornecimento de substratos e nutrientes.

Num reactor biológico, a dinâmica da variação da quantidade ou concentração de cada componente é explicada em termos de dois fenómenos:

1. o fenómeno de transformação ou variação da concentração (reacções químicas, bioquímicas e biológicas) de alguns componentes noutros componentes;

2. o fenómeno de transporte/transferência de massa (convecção, difusão) por trocas de líquido e/ou gás do reactor biológico com o ambiente exterior.

Dependendo do regime de alimentação, a operação dos reactores pode obedecer à seguinte classificação:

- operação descontínua: não há adição de substrato para além do colocado inicialmente, nem retirada do meio de cultura até ao final do processo;
- operação semicontínua;
- operação contínua.

A mistura é uma das operações mais importantes em reactores biológicos. Para que se obtenham as condições ideais para fermentação, as células devem ter acesso a todos os substratos, incluindo oxigénio em culturas aeróbias. Se a mistura não for adequada, em particular na manutenção de uma concentração uniforme de biomassa, existirão gradientes de concentração de nutrientes, podendo ocorrer esgotamento de nutrientes em zonas em que há sedimentação da biomassa. A mistura também desempenha um papel relevante na transferência de calor em reactores biológicos. É fundamental que os reactores tenham capacidade para transferir calor de e para o meio de modo a que se mantenha a temperatura adequada de fermentação.

A mistura em reactores biológicos pode ser efectuada de diferentes modos:

- por agitação mecânica;
- pneumaticamente;
- por circulação forçada recorrendo ao sistema de bombeamento;
- por combinação dos processos indicados anteriormente.

Naturalmente que o tempo de mistura depende de variáveis tais como as dimensões do tanque e do agitador, das propriedades do fluido e da velocidade do agitador.

O reactor agitado mecanicamente é constituído por um vaso cilíndrico em que a altura é igual ou maior do que o dobro do diâmetro da base. Possui um agitador

mecânico instalado na parte inferior do reactor, colocado a uma distância da base igual ao seu diâmetro. Esta colocação do agitador tem a ver com a eficiência do processo de mistura a transferência de massa: se o agitador for colocado a um nível inferior, ocorre um decréscimo no consumo da potência fornecida; numa posição mais elevada, para caudais de ar maiores, as bolhas não circularão no compartimento inferior.

Para evitar a formação de vortex, estes reactores são equipados com anteparas, normalmente 4, cuja largura é 1:10 ou 1:12 do diâmetro do reactor.

O cultivo de leveduras, em meio com baixo teor de azoto assimilável, apresenta acentuada síntese de hidratos de carbono e isso pode afectar a viabilidade das células. As células de leveduras que sofrem restrição de nutrientes como o enxofre e o fósforo acumulam grande quantidade de hidratos de carbono de reserva, demonstrando que a acumulação destes açúcares pode ser proporcionada, de uma maneira geral, pela limitação de nutrientes no substrato de crescimento. (Di Serio, et al., 2001)

Para além de outros aspectos económicos, o processo bem sucedido é o que resulta de um compromisso equilibrado entre otimizar a produção, minimizar a contaminação, assegurar a estabilidade genética do microrganismo e a qualidade do produto.

Os valores de pH e temperatura, a que decorre a fermentação, devem ser criteriosamente escolhidos de acordo com o microrganismo ou microrganismos utilizados. Estas variáveis influenciam directamente a actividade microbiana, podem contribuir para estabelecer condições selectivas, minimizando possíveis contaminações por microrganismos indesejáveis, e podem afectar a morfologia das células, influenciando indirectamente a produtividade do processo. O mesmo se pode dizer em relação a outras condições de fermentação ainda não referidas (velocidade agitação, oxigénio dissolvido, densidade celular, etc.).

É em situações de limitação por nutrientes específicos (por exemplo, fonte de fósforo) que muitas vezes os microrganismos optimizam a produção e/ou secreção dos seus metabolitos. Estas situações podem ser criadas através de uma escolha adequada do meio de cultura e do método de operação do fermentador.

Os parâmetros processuais mais comuns, que influenciam o percurso da fermentação alimentar, são as concentrações de ácido, de álcool, de sal e de oxigénio,

assim como o uso, ou não, de culturas de arranque e a temperatura, já que estes são os factores extrínsecos que restringem a evolução ecológica, em termos qualitativos e quantitativos.

As fermentações aeróbias são processos arejados, pelo facto de os microrganismos necessitarem de oxigénio de forma a desenvolverem-se apropriadamente. O oxigénio molecular é usado pelos microrganismos aeróbios como oxidante para as suas necessidades energéticas. Este processo, denominado respiração, pode decorrer através de diferentes vias metabólicas, dependendo do tipo de substrato e do tipo de microrganismo. Em suma, o oxigénio dissolvido no meio de cultura pode ser encarado como um substrato adicional.

2.4.8. Modelação da fermentação: estimação de parâmetros

Introdução

As experiências laboratoriais com os microrganismos permitem estudar as condições nutricionais e ambientais de determinado microrganismo e obter resultados. A sua expressão na forma matemática é primordial para que outros investigadores os possam ler e utilizar. O objectivo da obtenção de resultados laboratoriais é obtê-los em pequena escala para serem utilizados em escala superior, no projecto de biorreactores industriais.

As experiências iniciais sobre crescimento de microrganismos são laboratoriais e realizam-se em erlenmeyers agitados, 100, 500 e 1000 mL em incubadoras orbitais. Passada esta etapa, passa-se à dos biorreactores de 2, 5 e 10 L. Estes utilizam-se em descontínuo, em descontínuo com adição de substrato e em contínuo. O seguimento do processo fermentativo, realizado com utilização de equipamento de medida e de controlo, torna este sistema fermentativo mais eficaz para a obtenção de dados. A formulação de modelos com estes valores experimentais é importante na tomada de decisões em relação ao aumento de escala.

A obtenção do modelo tem em conta os modos de funcionamento e as capacidades de medida dos vasos reaccionais. A utilização de erlenmeyers agitados em incubadora orbital são o procedimento mais eficaz no início da investigação, podem-se realizar várias experiências de uma só vez de uma forma económica e de um modo

rápido observar e controlar diferentes condições experimentais: microrganismo; substrato; temperatura; agitação; pH; diferentes fontes de azoto; variação de suplementos nutricionais, etc.

Definido o programa experimental, é necessário trabalhar os resultados. Algumas pressuposições devem ser feitas, as condições laboratoriais impostas à fermentação estão a ser cumpridas (McNeil et al., 1990):

- a mistura reaccional está homogeneamente agitada em todo o caldo da fermentação;
- as células crescem, ou não são viáveis;
- pode-se ignorar a produção de produtos, como o etanol, no caso de leveduras;
- estão presentes os substratos essenciais como fonte de carbono e de azoto;
- o oxigénio está a ser fornecido em excesso relativamente às necessidades do metabolismo e produção de energia.

Esta lista não é exaustiva, cada fermentação é um caso especial. A próxima etapa consiste em decidir como os resultados obtidos podem ser utilizados para caracterizar o processo fermentativo, devendo responder às seguintes questões (McNeil and Harvey, 1990; Doran, P.M., 1997):

- Qual é a velocidade de crescimento máxima do microrganismo?
- Que quantidade de fonte de carbono deve ser utilizada para o crescimento e para a manutenção?
- Qual é a necessidade de azoto do microrganismo?
- É o crescimento estritamente aeróbio?
- Existem produtos ou metabolitos durante o processo fermentativo a interferir, como por exemplo, etanol e outros álcoois, ácidos de peso molecular reduzido a serem produzidos em quantidades reduzidas.
- A presença de substâncias no meio pode influenciar o percurso fermentativo, e portanto originar novos enzimas e diferentes produtos.

O modelo que descreve o crescimento está baseado usualmente no modelo de Monod:

$$\frac{dx_v}{dt} = r_X = \mu_m \frac{S}{K_s + S} X_v \quad (2.4.8.1)$$

onde r_X é a velocidade de crescimento celular (*kg de células m⁻³ h⁻¹*), S é a concentração da fonte de carbono (*kg da fonte de carbono m⁻³*), X_v é a concentração de células viáveis (*kg de células m⁻³*). Nesta equação há três variáveis que podem ser obtidas a partir dos dados experimentais: r_X , a velocidade de crescimento celular (*kg de células m⁻³ h⁻¹*), μ_{\max} a velocidade específica de crescimento (*kg células m⁻³ kg células⁻¹ h⁻¹*) e K_s a constante de saturação para o substrato (*kg da fonte de carbono m⁻³*). Estas são parâmetros característicos de um determinado microrganismo e devem permanecer constantes se as condições ambientais e nutricionais permanecerem inalteradas. Estes parâmetros podem pois ser utilizados para fins de projecto.

Em seguida, interessa-nos caracterizar a velocidade de consumo do substrato que é dada por::

$$\frac{dS}{dt} = -r_s = \left\{ -\frac{r_X}{Y'_{X/S}} + \frac{r_P}{Y'_{P/S}} + m_s X_v \right\} \quad (4.2.8.2)$$

onde r_s é a velocidade de consumo de substrato (*kg de fonte de carbono m⁻³h⁻¹*), $Y'_{X/S}$ é o factor rendimento da biomassa obtida a partir do substrato consumido (*kg células/kg da fonte de carbono*) e m_s é a constante de manutenção (*kg da fonte de carbono/(kg de células.h)*).

r_s é variável, enquanto que $Y'_{X/S}$ e m_s são parâmetros.

Podiam-se escrever equações idênticas para o consumo de azoto, para a produção de produto extracelular, para a produção de enzima, etc.. Os valores Y' dizem respeito a valores determinados experimentalmente, os valores de Y são os valores teóricos obtidos estequiometricamente.



2.4.8.1. Equações de balanço

Há cinco variáveis nas equações. S e X_V que se obtêm a partir das análises de concentração e peso seco. Para obter r_X , e r_S necessita-se de realizar um balanço de massa, como se está a considerar um sistema fechado, tem-se:

A velocidade de acumulação ou de desaparecimento = a velocidade de crescimento ou de consumo.

A velocidade de acumulação ou de desaparecimento é uma variação da concentração dividida pelo intervalo de tempo sobre a qual ela ocorre:

$$\frac{\text{concentração}_2 - \text{concentração}_1}{\text{tempo}_2 - \text{tempo}_1}$$

no caso de células, expressas pelo peso seco tem-se

$$\frac{X_{V2} - X_{V1}}{t_2 - t_1}$$

onde X_{V1} , X_{V2} são a concentração de biomassa no tempo t_1 e t_2 respectivamente (kg m^{-3}), e t_1 , t_2 são o tempo (h), às quais as amostras 1 e 2 foram retiradas. Abreviadamente pode-se escrever:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} \quad \text{e quando } t \text{ se torna infinitesimal, tem-se: } \frac{dX}{dt}.$$

Representando X em função do tempo nós podemos determinar $\frac{dX}{dt}$ por três

métodos para um sistema fermentativo descontínuo fechado:

- pela tangente à curva, medida do coeficiente angular;
- considerar a diferença entre os valores igualmente espaçados e dividi-los pelo intervalo de tempo correspondente, e realizar uma diferenciação numérica;
- o método mais aproximado está relacionado com a equação empírica que melhor represente os dados e normalmente no caso de crescimento celular é a utilização equação exponencial da zona de crescimento.

2.4.8.2. Estimação dos parâmetros μ_m e K_S

Os parâmetros da equação de Monod podem ser determinados utilizando as equações baseadas na técnica de separação de variáveis e utilizando a representação gráfica. As equações Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Langmuir são as mais utilizadas para retirar os valores dos parâmetros, μ_m e K_S .

A tabela seguinte (Tabela 2.2.) facilita a utilização dos respectivos dados por exemplo na representação gráfica da equação Lineweaver-Burk,

$$\left(\frac{1}{\mu_m} = \frac{K_S}{\mu_m S} + \frac{1}{\mu_m} \right)$$

Tabela 2.2 – Variáveis e respectivas unidades.

Tempo	X_V	$r_X = dx/dt$	μ	$1/\mu$	S	$1/S$
H	$kg\ c\acute{e}l.m^{-3}$	$kg\ c\acute{e}l.m^{-3}\ h^{-1}$	h^{-1}	h	$kg\ glucosem^{-3}$	$m^3kgc\acute{e}lulas^{-1}$

Representando $1/\mu$ em função de $1/S$ obtém-se uma linha recta com coeficiente angular K_S/μ_m e ordenada na origem $1/\mu_m$. Com estes valores pode-se determinar os parâmetros μ_m e K_S .

2.4.8.3. Estimação de $Y'_{X/S}$, m_s , $Y_{P/S}$

Utilizando a equação de Lineweaver-Burk para exprimir a equação:

$$\frac{dS}{dt} = -r_s = \left\{ -\frac{r_X}{Y'_{X/S}} + m_s X_V \right\}$$

tem-se:

$$\frac{r_s}{X_V} = \frac{1}{Y'_{X/S}} \frac{r_X}{X_V} + m_s$$

A tabela seguinte (Tabela 2.3) permite a aplicação dos valores experimentais utilizando a equação Lineweaver-Burk,

$$\frac{r_S}{X_V} = \frac{1}{Y'_{X/S}} \frac{r_X}{X_V} + m_S:$$

Tabela 2.3 – Variáveis e respectivas grandezas.

Tempo	X_V	S	$r_X = dX/dt$	$r_S = dS/dt$	r_S/X_V	r_X/X_V
H	$kg\ cél.m^{-3}$	$kg\ glucose\ m^{-3}$	$kg\ cél.m^{-3}\ h^{-1}$	$kg\ glucose.m^{-3}\ h^{-1}$	$kg\ glucose.m^{-3}\ h^{-1}/kg\ cél.m^{-3}$	$kg\ células.m^{-3}\ h^{-1}/kg\ cél.m^{-3}$

Representando r_S/X_V em função de r_X/X_V obtém-se uma linha recta com coeficiente angular $1/Y'_{X/S}$ e ordenada na origem m_S . Assim se determinam os parâmetros $1/Y'_{X/S}$ e m_S .

A partir dos parâmetros obtidos podemos representar os modelos e comparar as curvas obtidas para cada uma das equações com os dados experimentais. Na utilização dos modelos as condições iniciais e as restrições seguintes têm de ser consideradas.

Condições iniciais: X_v (no tempo zero) = X_{v0} ; S (no tempo zero) = concentração inicial da fonte de carbono, por exemplo glucose.

Restrições: $X_v > 0$; $0 \leq S \leq S$ no tempo zero.

Quando o modo de funcionamento do biorreactor é descontínuo com adição de substrato durante a fermentação ou é contínuo, as equações de balanço de massa têm de ter em conta no primeiro caso as entradas de meio durante a fermentação e no segundo caso a velocidade de acumulação ser igual à velocidade de entrada menos a da saída.

2.5. Metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces é um microrganismo que é capaz de crescer em aerobiose ou em anaerobiose, por isso é classificado como um ser anaeróbio facultativo (Fonseca, M. M. e outros, 2007).

O metabolismo tem como objectivo central a manutenção e a multiplicação da massa celular associada à síntese dos diferentes componentes celulares (Lima, N. e outro, 2003).

Após a entrada na célula, os açúcares são oxidados através da Via Embden-Meyerhof ou Glicólise obtendo-se Piruvato, o qual dependendo da disponibilidade de Oxigénio é reduzido a Etanol ou segue a via aeróbia através do Ciclo de Krebs e Cadeia Respiratória.

2.5.1. Glicólise

O processo da Glicólise ocorre no citoplasma e as várias etapas do Ciclo de Krebs e da Cadeia Respiratória decorrem nas mitocôndrias.

Os glúcidos são degradados produzindo-se intermediários carbonados, com algum poder redutor sob a forma de NADH e NADPH e energia, este processo é designado por catabolismo.

O metabolismo inclui o catabolismo e o anabolismo celular, ocorrendo através de reacções enzimáticas e por regulação de determinadas vias metabólicas (Ratledge, 1990;).

Os glúcidos são utilizados com principal fonte de carbono e de energia, destacando-se a glucose como a maior fonte de energia.

O catabolismo aeróbio da glucose inicia-se com a Glicólise. Esta primeira etapa tem lugar no citosol sem a intervenção do oxigénio, produzindo 2 moléculas de ácido pirúvico por cada molécula de glucose. O processo da Glicólise tem como função

recuperar a energia armazenada na glucose, sendo a energia posta à disposição das funções celulares sob a forma de ATP, de acordo com a equação:



A Glicólise corresponde a uma sequência de reacções, das quais se destacam:

1. Fosforilação da glucose, Figura 2.14

A glucose é fosforilada a glucose-6-fosfato, na presença de ATP e da hexocinase que actua na presença do cofactor Mg^{2+} .

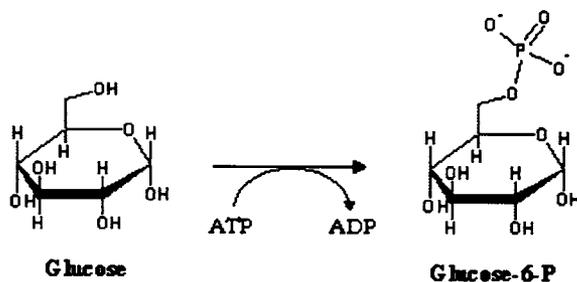


Figura 2.14 – Fosforilação da glucose.

2. Isomerização da glucose, Figura 2.15

A glucose-6-fosfato é isomerizada a frutose-6-fosfato, através da glucose-fosfato isomerase.

3. Fosforilação da frutose-6-fosfato, Figura 2.16

Nesta reacção obtém-se a frutose-1,6-difosfato, a qual é catalizada pelo enzima fosfofruto-quinase, tendo como cofactor o ião Mg^{2+} .

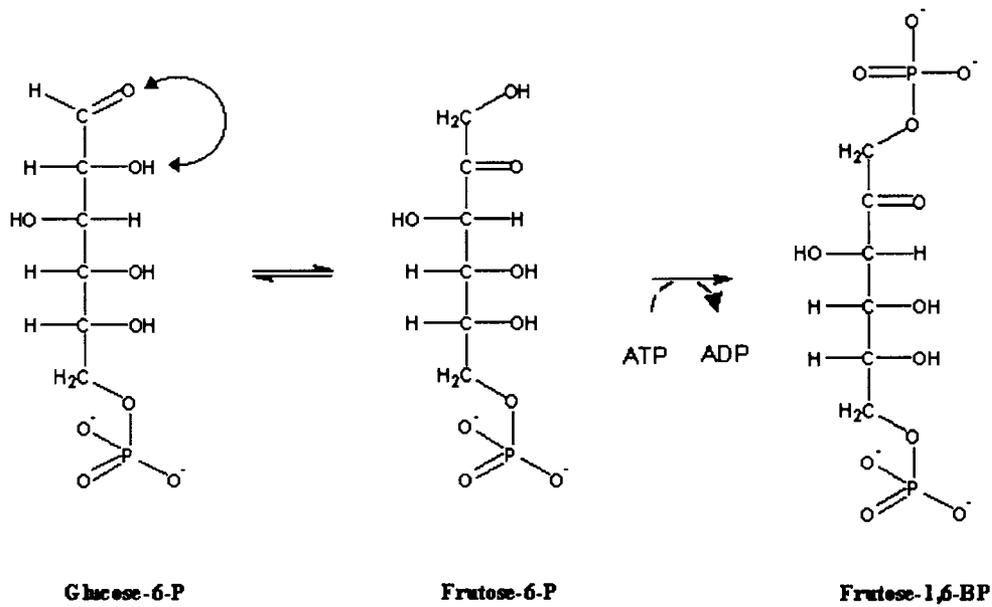


Figura 2.15 – Isomerização da glucose seguida da Fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-difosfato.

4. Cisão da frutose-1,6-difosfato em trioses-fosfato, Figura 2.16

A clivagem da frutose-1,6-difosfato devida a uma aldolase permite obter duas trioses, o gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato, dois isómeros interconvertíveis pela acção da triosefosfato-isomerase. O equilíbrio da reacção desloca-se gradualmente no sentido da formação do gliceraldeído-3-fosfato que é o composto que intervém nas reacções da Glicólise, Figura 2.16.

5. Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, Figura 2.17

O enzima gliceraldeído-3-P-desidrogenase e o cofactor NAD^+ são responsáveis pela transformação do gliceraldeído-3-fosfato em ácido-1,3-difosfoglicérico.

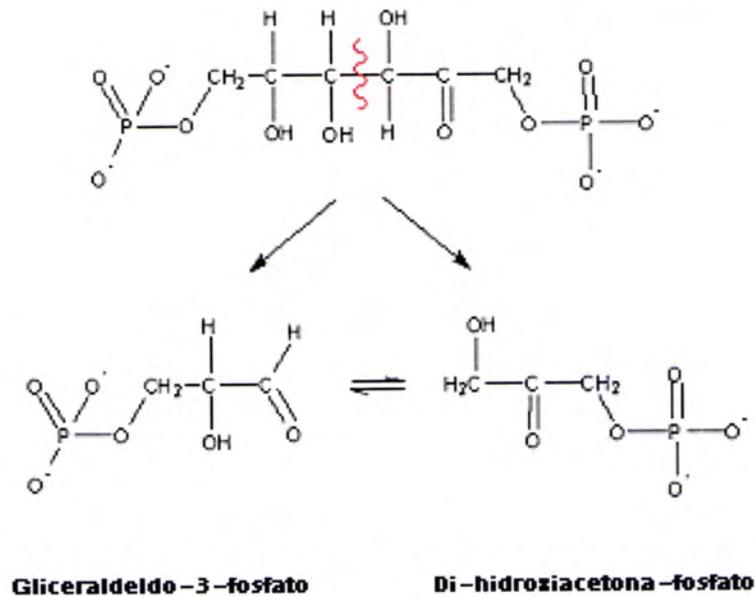


Figura 2.16 – Cisão da frutose-1,6-difosfato e posterior cisão nos isómeros interconvertíveis: Gliceraldeído-3-fosfato e Di-hidroxiacetona-fosfato. À medida que o gliceraldeído-3-fosfato é utilizado na reacção seguinte, a di-hidroxiacetona transformar-se-á no seu isómero e sofrerá a oxidação tal como o seu isómero.

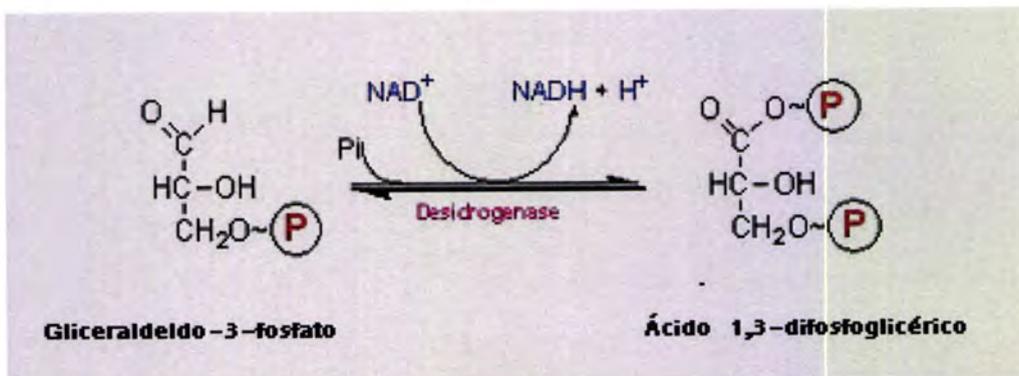


Figura 2.17 – Oxidação do Gliceraldeído-3-fosfato.

6. Hidrólise do ácido difosfoglicérico, Figura 2.18

Durante esta reacção, a energia libertada é transferida para síntese de ATP.

O enzima que catalisa esta reacção denomina-se 3-fosfoglicerato-quinase cujo cofactor é Mg^{2+} .

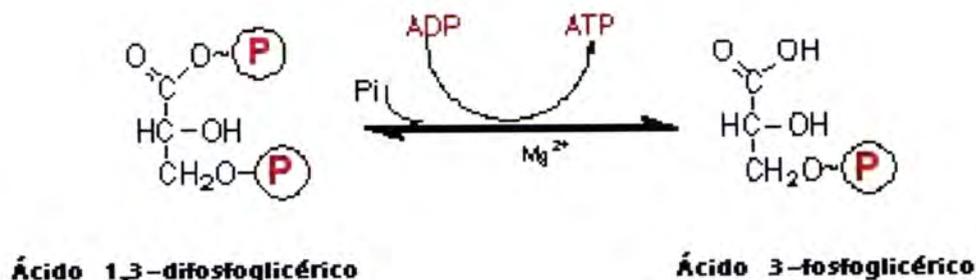


Figura 2.18 – Hidrólise do ácido difosfoglicérico.

7. Formação do ácido pirúvico, Figura 2.19

As três últimas reacções conduzem à formação do ácido pirúvico e são catalisadas por fosfoglicerato-mutase, enolase e piruvato-quinase, respectivamente.

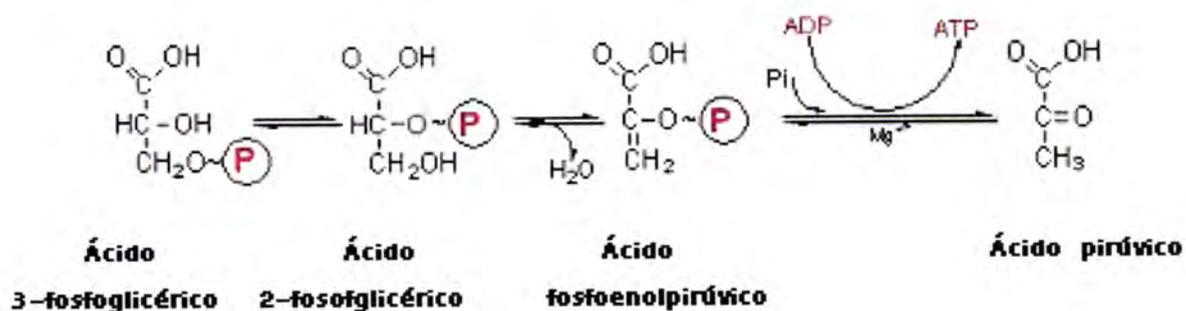


Figura 2.19 – Reacções finais de Glicólise.

Para a Glicólise ocorrer é necessário utilizar dois ATP, mas produzem-se quatro ATP, portanto o balanço energético diz-nos que no processo obtêm-se 2 ATP, como se pode observar na Figura 2.20. O NAD^+ tem de ser regenerado, caso contrário a Glicólise pára, uma vez que é substrato de uma das reacções. Em condições aeróbias, o NADH transfere os seus electrões para a cadeia transportadora de electrões. Na ausência

de O_2 o NADH transfere os seus electrões para o próprio piruvato, dando origem a lactato. É o que se denomina por fermentação: um processo em que o aceitador final dos electrões provenientes da degradação é um produto orgânico da própria degradação.

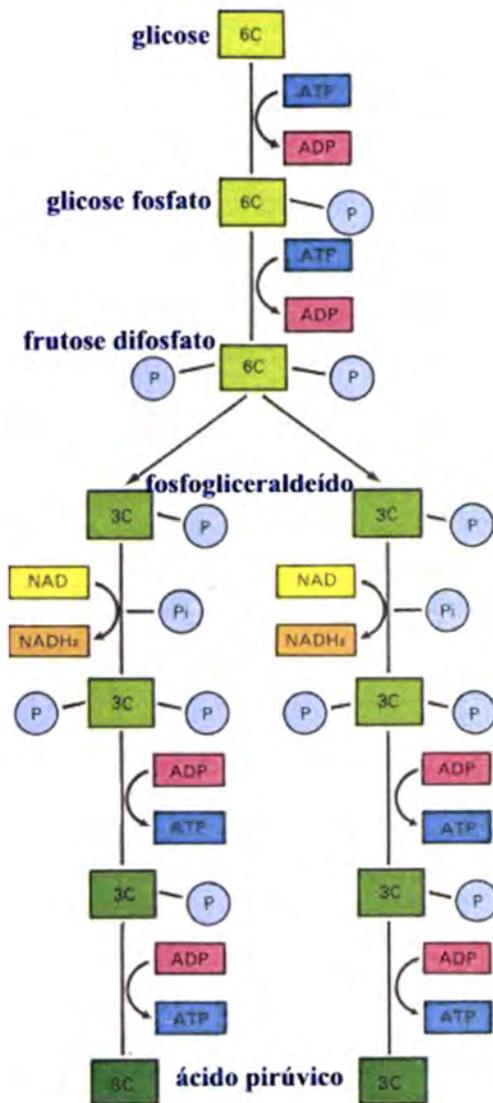


Figura 2.20 - Esquema global da Glicólise
(<http://curlygirl.naturlink.pt>, acessível em 5/10/07)

2.5.2. Condições aeróbias

Desde que haja disponibilidade de oxigénio a Glicólise prossegue através do Ciclo de Krebs (ou Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos).

2.5.2.1. Ciclo de Krebs

Para o ácido pirúvico ou piruvato entrar no Ciclo de Krebs tem de ser previamente convertido em acetilcoenzima A (Acetil-CoA). Esta transformação tem lugar na matriz mitocondrial e processa-se em várias etapas catalisadas por um complexo enzimático chamado piruvato-desidrogenase, denominado desta forma por contém vários cofactores: lipoamida, FAD e coenzima A.

A primeira reacção do Ciclo de Krebs, consiste na formação do ácido cítrico a partir a adição do acetil-CoA ao ácido oxaloacético, esta reacção é catalisada pela enzima citrato-sintetase.

A obtenção do ácido cis-acónico constitui a segunda etapa deste ciclo e é conseguida graças à presença de enzima Acotinase. Esta enzima também catalisa a conversão do Ácido cis-acónico em ácido isocítrico.

Este por sua vez é descarboxilado a ácido α -cetoglutárico (este composto possui tal como o ácido pirúvico um grupo carbonilo adjacente ao grupo ácido carboxílico e portanto, da sua descarboxilação resulte energia suficiente para que se forme uma ligação tioéster com a coenzima A) surgindo Succinil-CoA.

A hidrólise de Succinil-CoA é catalisada pela succinato-tioquinase originando o ácido succínico.

As etapas seguintes do Ciclo de Krebs têm como objectivo regenerar o ácido oxaloacético. Assim o ácido succínico dará origem ao ácido fumárico, este ao ácido málico e este por sua vez ao ácido oxaloacético, estas transformações são catalisadas pelas enzimas succinato-desidrogenase, fumarase e málico-desidrogenase, respectivamente.

As principais etapas do Ciclo de Krebs estão representadas na Figura 2.21.

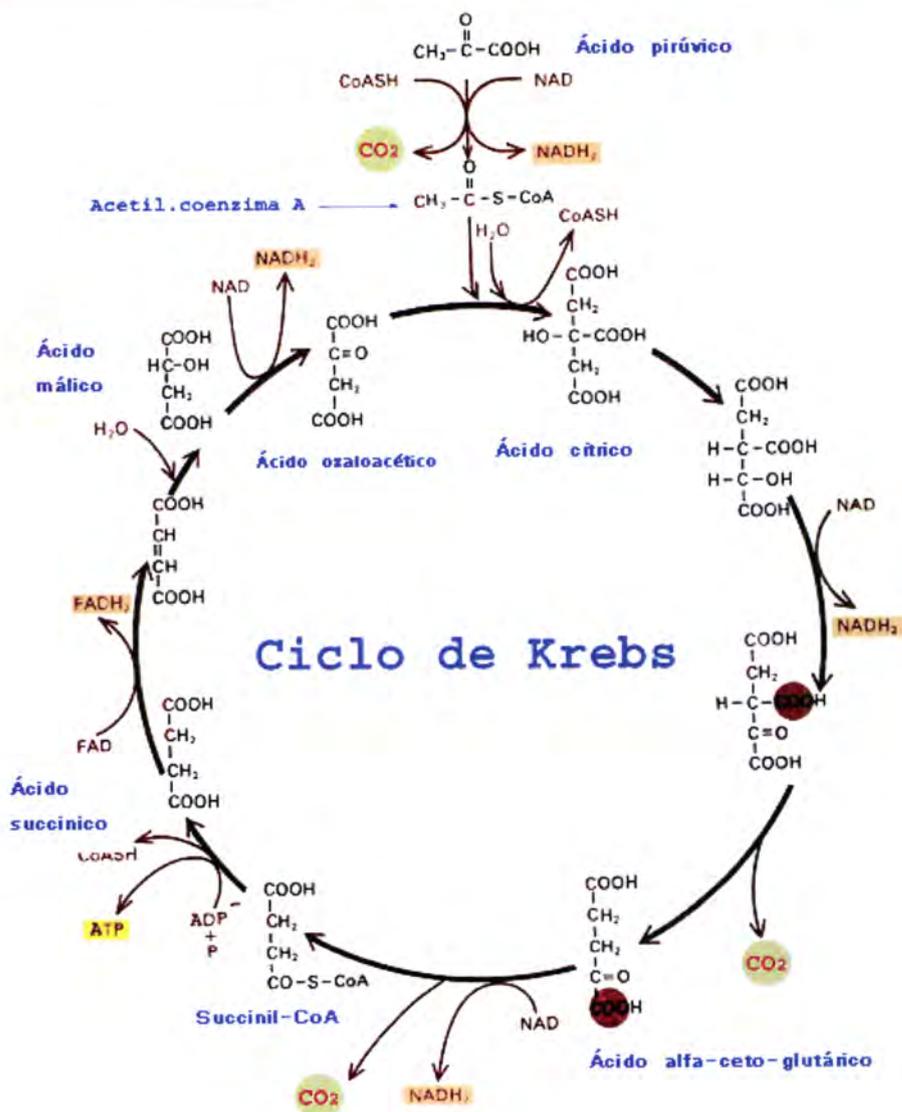


Figura 2.21 - Principais etapas do Ciclo de Krebs. (adaptado de www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/respiracao.htm, acessível em 5/10/08)

2.5.2.2.Cadeia Respiratória

Na terceira etapa designada por fosforilação oxidativa, a membrana interna desempenha um papel fundamental, porque é nela que se localizam complexos proteicos, susceptíveis de captar e de ceder electrões. Estas proteínas movimentam-se devido à fluidez da membrana possibilitando as transferências de electrões, surgindo assim a designação de cadeia de transporte de electrões.

Ao longo desta cadeia, os electrões deslocam-se desde o NADH_2 ou um FADH_2 , com potencial redox negativo até ao oxigénio (aceitador final) que possui um potencial redox positivo, de tal forma que a transferência de electrões do NADH_2 ao oxigénio se efectua com uma grande variação de energia livre, energia essa utilizada na síntese do ATP.

Os citocromos bc_1 e c integram os complexos III e V, são pequenas proteínas solúveis que desempenham um papel muito importante na cadeia respiratória, sendo responsáveis pela transferência de electrões entre o complexo III e o IV.

A Figura 2.22 representa de forma muito simplificada a cadeia de transporte de electrões, representando-se os vários complexos (complexos I, II, III, IV e V).

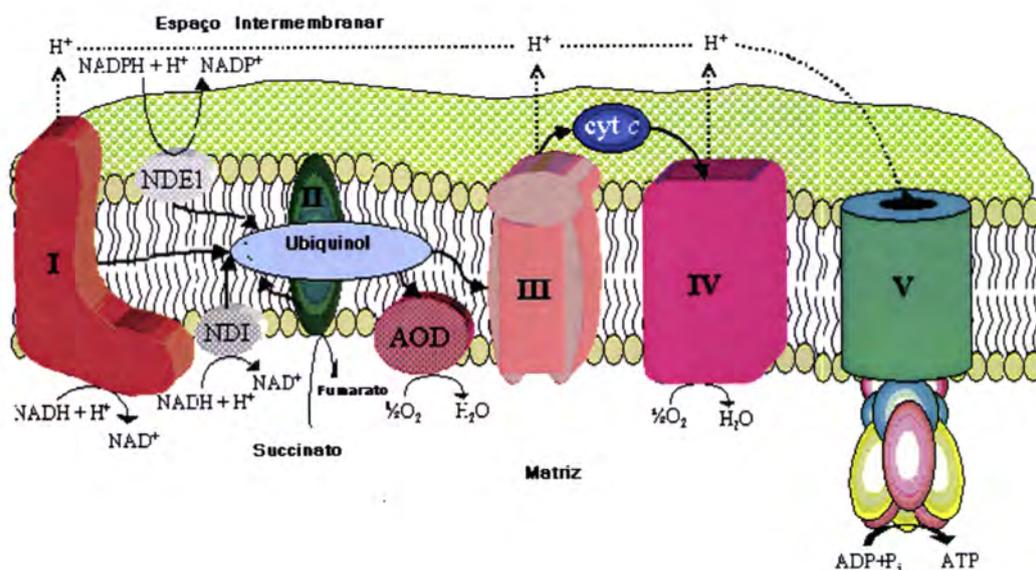


Figura 2.22 – Cadeia de transporte de electrões (adaptado de pages.slu.edu/faculty/kennellj/index.html, acessível em 5/10/08)

2.5.3. Condições anaeróbias

A *Saccharomyces* é descrita como um ser anaeróbio facultativo, o que significa que é capaz de proliferar segundo condições anaeróbias e aeróbias, sendo capaz de

utilizar como fontes de energia mono-, di- e oligossacáridos, etanol, acetato, glicerol, piruvato e lactato. A glucose é a fonte de carbono preferida. (Dickinson, R. e outro, 1999).

A fermentação é outra via metabólica para a degradação da glucose. No caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a fermentação é alcoólica porque um dos produtos desta cadeia de reacções é o etanol e não o lactato.

Nesta via, através de um processo dividido em duas etapas (Figura 2.23), em que na primeira o piruvato sofre a descarboxilação numa reacção irreversível catalisada pelo enzima piruvato desidrogenase formando-se o acetaldeído e dióxido de carbono. Este enzima requer a presença do ião Mg^{2+} e do coenzima tiamina pirofosfato.

Na segunda etapa, o acetaldeído através da acção do enzima álcool desidrogenase é reduzido a etanol, com o NADH derivado da actividade da 3-fosofato-gliceraldeído desidrogenase a ser regenerado em NAD^+ (Nelson, D. e outro 2000).

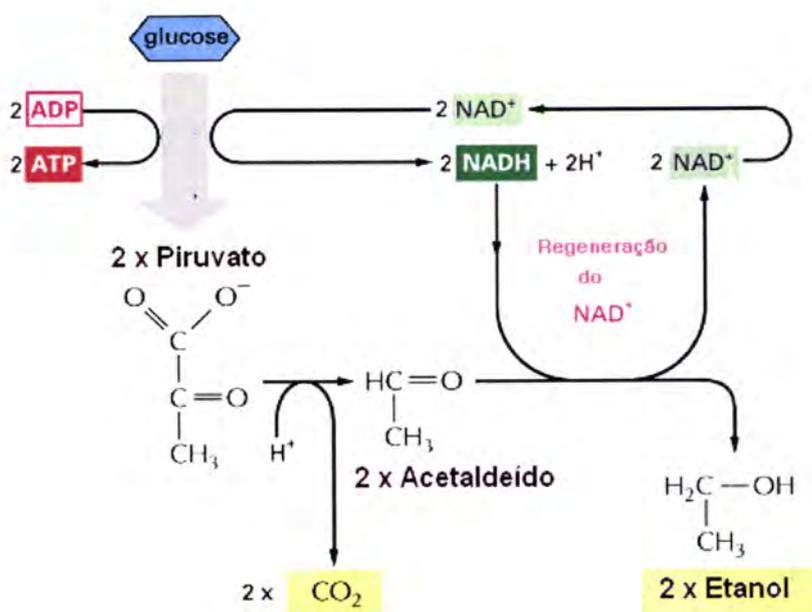


Figura 2.23 – Fermentação alcoólica (adaptado de

<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/cm1503/pyruvate.htm>, acessível em 11/10/08)

A família álcool desidrogenase presente na *Saccharomyces cerevisiae* (YADH, E.C.1.1.1.1) contém três coenzimas YADH-1, YADH-2 e YADH-3. A YADH-1 encontra-se no citoplasma e possui maior actividade enzimática do que as restantes. (Leskovac, V. e outro, 2002)

YADH-1 é um tetrâmero constituído por subunidades idênticas. Cada subunidade contém dois íões zinco. Um dos íões está coordenado com duas cisteínas (Cys-46 e Cys-174) e uma histidina (His-67) formando o centro activo da enzima (ZnCys₂His). (Figura 2.24) O outro íão Zn²⁺ está ligado a quatro cisteínas (cisteínas 97, 100, 103 e 111) assumindo este conjunto apenas o papel conformacional (Magonet, E. et al., 1992; Yang, Y. and Zhou, H-M., 2001).

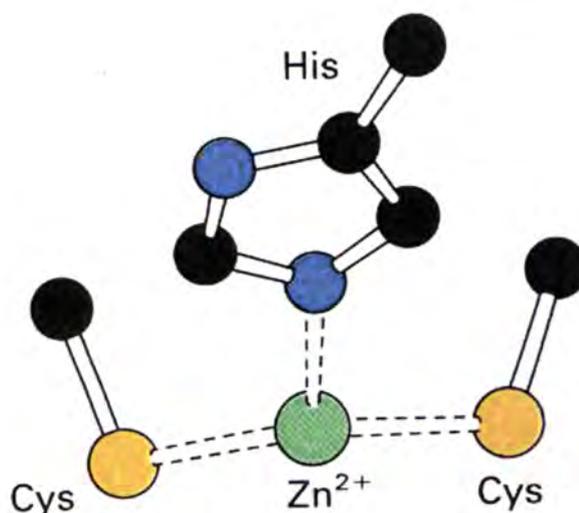


Figura 2.24 - Constituição do centro activo do enzima YADH-1.

(<http://www.chem.uwec.edu/Webpapers2001/clareymm/Pages/1/mech1.html>, acessível em 5/10/08)

A equação química geral que representa esta via metabólica é:



A fermentação permite obter pequena quantidade de energia, sendo a utilização desta via induzida pela limitação de oxigénio ou pela concentração muito elevada de açúcar.

2.5.4. Vias metabólicas alternativas à oxidação da glucose

Via das Pentoses-fosfato

As vias anabólicas que conduzem à produção de novo material celular necessitam para além de ATP, de poder redutor sob a forma de NADPH.

A via das Pentoses-fosfato consiste num conjunto de reacções que permite às células metabolizar a glucose-6-fosfato sem utilizar a via da Glicólise. Ao contrário da Glicólise, esta via é um processo essencialmente aeróbio e não necessita de ATP. (Campos, L. 2002)

O interesse desta via é múltiplo porque:

- fornece pentoses-fosfatos, indispensáveis à síntese dos nucleótidos;
- permite a formação de NADPH, necessário a diversas funções, nomeadamente à síntese de esteróis;
- pode permitir a oxidação de glucose em dióxido de carbono, com formação de ATP em quantidade apreciável. (Weil, J. 1983)

Na primeira etapa desta via a glucose-6-fosfato é oxidada no seu primeiro carbono, dando origem a 6-fosfoglucono- δ -lactona, por acção da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, gerando-se NADPH, Figura 2.25.

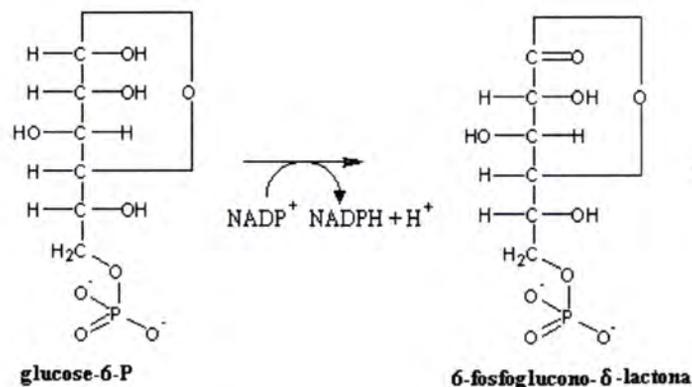


Figura 2.25 - Glucose-6-fosfato.

De seguida através do enzima lactonase, a 6-fosfoglucono- δ -lactona hidrolisa-se originando o 6-fosfo-gluconato, Figura 2.26.

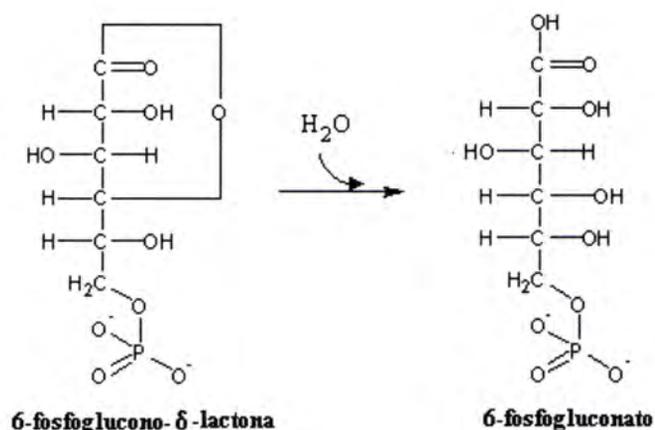


Figura 2.26 - Hidrólise do 6-fosfoglucono- δ -lactona.

O enzima 6-fosfogluconato-desidrogenase catalisa a terceira etapa desta via permitindo que o 6-fosfogluconato dê origem à ribulose-5-fosfato, libertando-se dióxido de carbono, originando-se mais NADPH e formando-se 5 ATP, Figura 2.27.

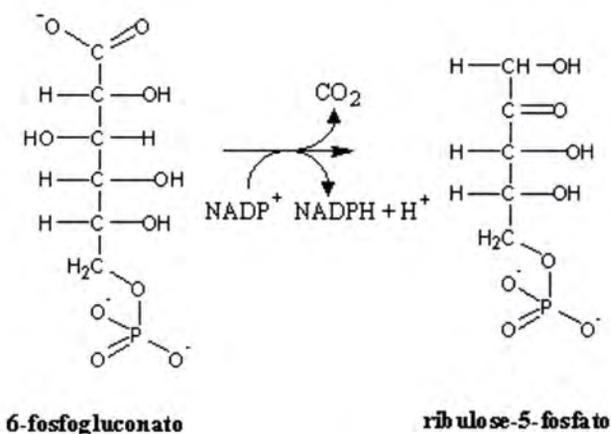


Figura 2.27 – Transformação do 6-fosfogluconato em ribulose-5-fosfato.

A quarta etapa consiste na isomerização da ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato através de acção do enzima Fosfo-ribo-isomerase e da xilulose-5-fosfato através da intervenção do enzima Fosfocetopentose-epimerase, Figura 2.28.

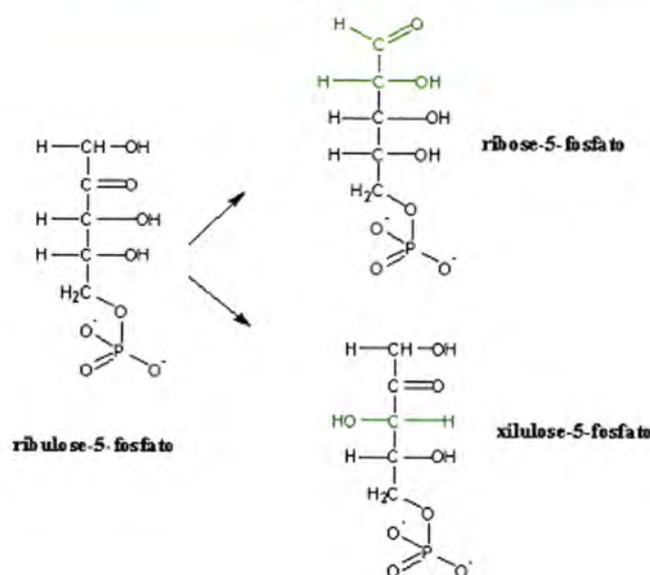


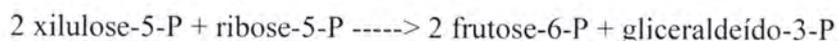
Figura 2.28 - Isomerização da ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato.

Estas duas reacções são importantes, porque representam o ponto de junção entre a primeira parte do ciclo - oxidação da glucose-6-fosfato em ribulose-5-fosfato e a segunda parte - interconversão das pentoses-fosfato e das hexoses-fosfato por transaldolização e transcetolização. (Weil, J., 1983)

As etapas seguintes dependem das necessidades da célula, se a célula só precisar de NADPH e não precisar de ribose-5-fosfato, esta poderá ser reaproveitada. Este reaproveitamento é realizado através de 3 reacções (Fig. 2.29):

- 1) a ribose-5-fosfato recebe dois carbonos da xilulose-5-fosfato;
- 2) são transferidos três carbonos da sedoheptulose-7-P para o gliceraldeído-3-P;
- 3) por transferência de dois carbonos da xilulose-5-P para a eritrose-4-P, forma-se outra molécula de frutose-6-P e uma molécula de gliceraldeído-3-P.

O balanço destas últimas reacções traduz-se por:



Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

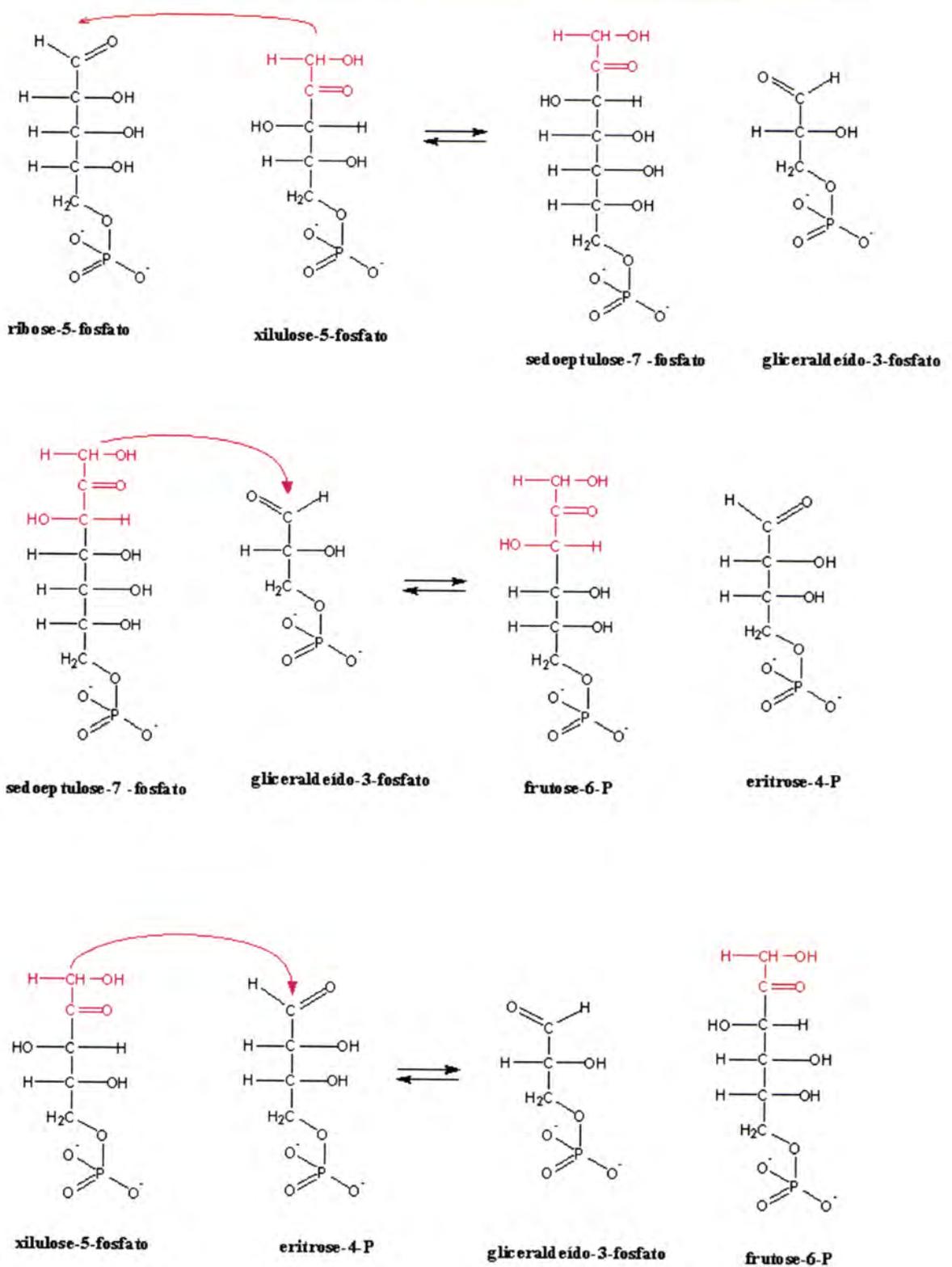


Figura 2.29 – Reaproveitamento da ribose-5-fosfato.

A frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato podem ser utilizados na Glicólise para produção de energia.

Quando as necessidades da célula em ribose-5-fosfato são superiores às de NADPH, a ribose-5-fosfato pode ser produzida a partir de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, como se pode observar no esquema que retrata a ligação entre Glicólise e a Via das Pentoses-fosfato (Fig.2.30).

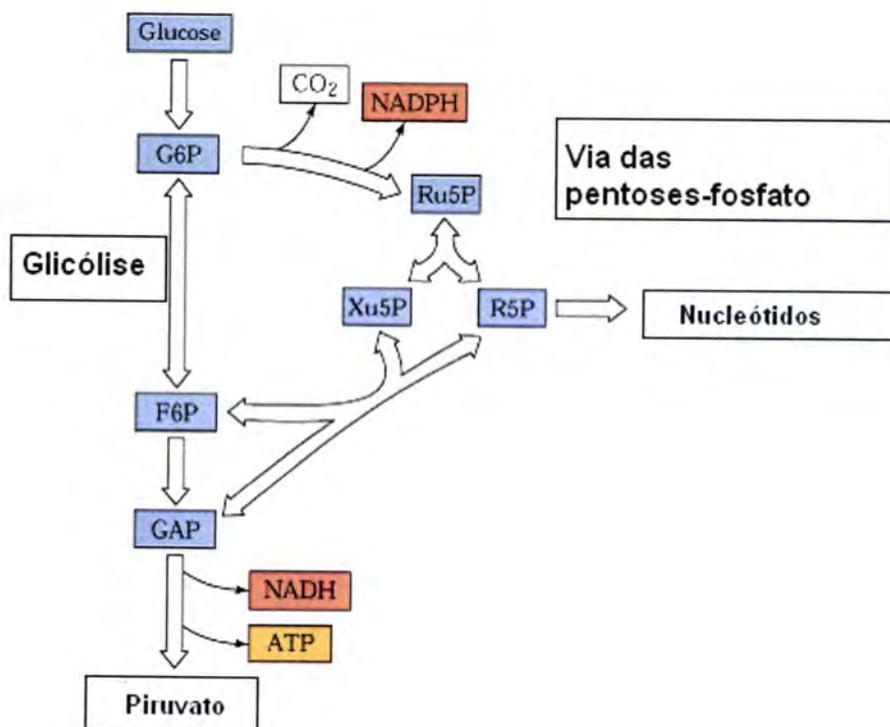


Figura 2.30 – Relação entre as vias Glicólise e Pentoses-fosfato. (adaptado de Voet, D. et al. 1999).

3. Fruto-oligossacáridos

O conhecimento científico considera existir uma correlação importante do benefício de certos alimentos na prevenção de doenças. Assim, aparece o alimento funcional que pode ser definido como um ingrediente que tem um impacto positivo na saúde do indivíduo, no desempenho físico e no estado mental. Nestes alimentos funcionais surgem os fruto-oligossacáridos.

Os fruto-oligossacáridos, FOS, são substâncias pré-bióticas que se encontram nos alimentos vegetais ou em produtos de origem microbiana. A principal produção comercial de FOS tem origem vegetal e na transformação enzimática da sacarose pelo enzima frutossiltransferase de origem microbiana.

Neste processo de obtenção, ao qual nos restringiremos, o desenvolvimento de enzimas mais eficientes, com elevada actividade e estabilidade, é desejada e isto tem suscitado o interesse de biotecnologistas e microbiologistas na investigação e na utilização de diferentes microrganismos na optimização da produção de enzimas. Neste sentido, iremos fazer uma revisão e discussão quer relativamente à identificação de microrganismos produtores destes enzimas quer à qualidade e quantidade de FOS obtidos. Além disso, tendo em consideração esta revisão de conhecimentos nesta área, planearemos investigação sobre a sua produção em fermentação submersa e optimizaremos as condições de produção e de utilização.

3.1. Produção de fruto-oligossacáridos

O interesse dos fruto-oligossacáridos, FOS, tem sido alvo da investigação científica e industrial devido às suas excelentes propriedades biológicas e funcionais na sua utilização como compostos pré-bióticos. São utilizados como componentes de alimentos funcionais. O seu valor no mercado é \$200/kg (Godshall 2007). Os FOS são adocicantes não energéticos e não cancerígenos que estimulam o crescimento das

bifidobactérias, e têm sido considerados como preventores do cancro do cólon e redutores dos níveis do colesterol, dos fosfolípidos e dos triglicéridos no soro (Moore et al. 2003, Sangeetha et al. 2005b).

Os FOS consistem numa mistura de oligómeros de frutose com duas a três unidades de frutose ligadas na posição β -2-1 da sacarose e são principalmente os 1-cestose (GF₂), nistose (GF₃), e frutofuranosil nistose (GF₄) (F) (Yun, 1996, Sangeetha et al. 2005a).

Os enzimas produtores de FOS são geralmente classificados como β -D-frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), com elevada actividade de transfrutossilase ou frutossiltransferase (FTase, EC 2.4.1.9). A FTase só possui actividade transfrutossilase, actua na sacarose pela clivagem da ligação β -1,2 e transferência do grupo para uma molécula aceitadora tal como a sacarose e fruto-oligossacáridos, perdendo glucose. No entanto, a FFase possui actividades hidrolíticas e de transfrutossilase. Esta última só se manifesta a elevadas concentrações de sacarose (Yun 1996, Sanchez et al. 2008). As propriedades catalíticas dos enzimas e as condições de produção e composição dos FOS variam de espécie para espécie.

3.2. Enzimas característicos

As propriedades do enzima FTase microbiano varia de acordo com o microrganismo e meio de cultura utilizado, especialmente com a fonte de carbono que pode assumir elevada importância indutora (Wang and Rakshit 2000; Nguyen et al. 2005). A purificação e caracterização da FTase estão tratadas por vários investigadores (Rehm e tal. 1998; L'Hocine et al. 2000; Nguyen et al. 2005).

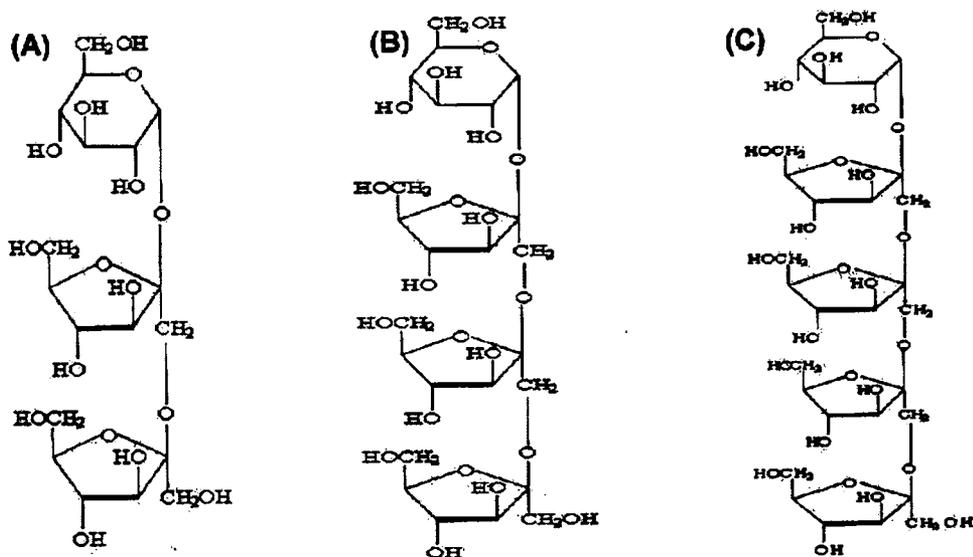
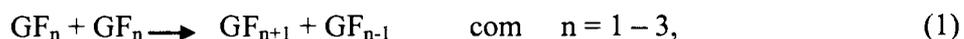


Figura 3.1 - Estrutura química dos principais fruto-oligossacáridos: (A) 1-cestose (GF₂), (B) nistose (GF₃), (C) frutofuranosil nistose (GF₄).

As massas moleculares variam entre 180 e 600 kDa e são homopolímeros com dois a seis unidades de monómeros. Os valores óptimos da temperatura e pH para as actividades destes enzimas estão referidos, respectivamente, entre 50 e 60°C e 4,5 a 6,5. A estabilidade térmica da FTase na forma intracelular de *Aureoasidium pullulans* foi monitorizada durante 8h. Verificou-se que a catálise foi desactivada a temperaturas superiores a 60°C mesmo a elevadas concentrações de substrato (Mandlová et al. 2000). O mecanismo da reacção depende da fonte do enzima e a pureza do enzima pode influenciar o seu modo de acção. O mecanismo aceite é a desproporcionação da reacção onde a FTase catalisa a transferência duma metade frutossil da sacarose ou um doador fruto-oligossacáridos para outra sacarose ou outro FOS aceitador para dar a formação de um FOS superior (Jung et al. 1989; Yun 1996, Sanchez et al. 2008). Este mecanismo pode ser esquematizado como se segue:



onde GF é a sacarose ou FOS e n é o número de unidades de frutossil.

3.3. Microrganismos produtores de frutossiltransferase

A FTase é produzida por diversos microrganismos, bactérias e fungos, intracelularmente e excretada para o meio extracelular, como se exemplifica na Tabela 3.1. A actividade frutossiltransferase e a actividade hidrolítica foram determinadas pela medida da glucose e da frutose presentes na mistura reaccional. Uma unidade de actividade frutossiltransferase é definida como a quantidade de enzima necessária para transferir 1µmole de frutose por minuto. Uma unidade de actividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 µmole de frutose livre por minuto. A produtividade enzimática é calculada como a actividade de frutossiltransferase (U_{iE}) e a actividade hidrolítica (U_{hE}) por volume de reacção, enquanto que a actividade específica foi calculada como a actividade de frutossiltransferase (U_{iS}) e a actividade hidrolítica (U_{hS}) por unidade de biomassa (Fernandez et al., 2004; Maiorano et al., 2008; Sanchez et al., 2008). A actividade de frutossiltransferase (U_i) e a actividade hidrolítica (U_h) são calculadas num dado intervalo de tempo expressas pelas equações 2 e 3 respectivamente:

$$U_i = \frac{(\mu\text{moleGlu}_{\text{cos } e_{i1}} - \mu\text{moleglu}_{\text{cos } e_{i0}}) - (\mu\text{molefrutos}_{e_{i1}} - \mu\text{molefrutos}_{e_{i0}})}{t_i - t_o} \quad (2)$$

$$U_h = \frac{\mu\text{moleFrutose}_{e_{i1}} - \mu\text{moleFrutose}_{e_{i0}}}{t_i - t_o} \quad (3)$$

A actividade específica e a produtividade volumétrica do enzima são avaliadas através das equações (3), (4), (5), (6) e (7), respectivamente.

$$U_{iS} = \frac{U_i}{\text{mg biomassa seca}} \quad (4)$$

$$U_{hS} = \frac{U_h}{\text{mg biomassa seca}} \quad (5)$$

$$U_{iE} = \frac{U_i}{\text{volume de reacção}} \quad (6)$$

$$U_{hE} = \frac{U_h}{\text{volume de reacção}} \quad (7)$$

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

Tabela 3.1. Resumo dos estudos de produção de FTase por diferentes microrganismos (Maiorano et al., 2008)

Microrganismo	Fonte de carbono	Condições do processo	Factores investigados	Actividade (U/mL)	Referências
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Sacarose 10g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=5,5; 720h	Fonte de carbono, pH inicial, agitação, tempo de cultura, aditivos	600	Dhake and Patil (2007)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCY 27-1-94	Sacarose 200-500g/L	Erlenmeyer 26h – 94h	Planeamento experimental (fonte de carbono, pH inicial, agitação, tempo e meio de cultura)	120	Vandáková et al. (2004)
<i>Aspergillus oryzae</i> CRF202	Sacarose 10g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=5,5; 250rpm	Planeamento experimental (conc de sacarose, pH, tempo de cultura, condução do processo)	NA	Sangeetha et al. (2005c)
<i>Aspergillus japonicus</i> TIT-KJI	Sacarose 200g/L	Erlenmeyer T=30°C; 200rpm; 36h	Produção de FOS	NA	Chien e tal. (2001)
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	Sacarose 10g/L	Erlenmeyer T=37°C; pH=7,0; 200rpm; 12h	Fonte de carbono, pH, tempo de cultura, adição de sais	6	Kim et al. (2000)
<i>Aureobasidium pullulans</i> KCCM12017	Sacarose 100g/L	Erlenmeyer T=28°C; pH=7,4; 200rpm; 48h	Produção de FOS	121	Shin et al. (2004)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	Sacarose 200g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=5,5; 250rpm; 48-120h	Produção de FOS	NA	Sangeetha et al. (2004a)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL330	Sacarose 50g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=5,0; 190rpm; 120h	Sacarose e concentração de sais, fontes de azoto e condução do processo	(58,3 U/lh) ^a	Balasubramamiam et al. (2001)
<i>Aspergillus niger</i> IMI 303386	Sacarose 20g/L	Erlenmeyer T=28°C; pH=7,4; 200rpm; 48h	Purificação da FTase	0,022	Nguyen et al. (2005)
<i>Aspergillus japonicus</i> TIT90076	Sacarose 266g/L	Erlenmeyer T=30°C; 200rpm; 120h	Planeamento experimental (sacarose, azoto, sais, concentração de aditivos e fontes, pH e temperatura)	910	Chen (1995)
<i>Aspergillus japonicus</i> JN19	Sacarose 150-180g/L	Erlenmeyer T=28°C; pH=5,5 200rpm; 72h	Sacarose, conc. de íões metálicos e de aditivos, fontes de azoto, pH inicial e tempo de cultura.	55,42	Wang and Zhou (2006)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR77	Sacarose 200g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=5,5; 250rpm; 24h	Purificação de FTase	616,8	Lateef et al. (2007)
<i>Aspergillus japonicus</i> TIT90076	Sacarose 266g/L	Erlenmeyer T=30°C; 200rpm; 24h	Concentração de sais e de aditivos, e planeamento experimental (fontes de carbono e de azoto).	660	Chen and Liu (1996)
<i>Aureobasidium pullulans</i> KFCC10524	Sacarose 200-280g/L	Erlenmeyer T=30°C; pH=6; 200rpm; 108h	Concentração de sacarose, modos de condução do processo	101,2	Yun et al. (1997)
<i>Penicillium citricum</i> FERM P-15944	Sacarose 100g/L	Biorreactor: T=30°C; pH=4,0; 0,5Lar/min; 100rpm ; 72h	Produção de FOS	NA	Hayashi et al. (2000)
<i>Aspergillus foetidus</i> NRRL337	Maltose 10g/L	Biorreactor e Erlenmeyer T=30°C; pH=5,0	Fontes de carbono, concentração de maltose, pH, temperatura, modos de condução do processo	0,52	Wang and Rakshit (1999)
<i>Rhodotoula</i> sp.	Açúcar reduzido 60g/L	Biorreactor: pH=4,5; 1,5vvm; 650rpm	Planeamento experimental (pH, agitação e arejamento)	20	Barbosa (2007)
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	Sacarose 15g/L	Biorreactor: T=30°C; pH=4,0; 0,5Lar/min; 100rpm ; 72h	Purificação de FTase	11	Park et al. (2001)
<i>Penicillium citrinum</i> KCTC18080P	Sacarose 200g/L	Biorreactor: T=28°C; pH=6,0; 36h 0,5Lar/min; 500rpm ; 1,5vvm;	Fontes de carbono e de agitação	0.053	Lime et al. (2006)
<i>Aspergillus niger</i> AS0023	Sacarose 175g/L	Biorreactor: T=30°C; pH=6,0; 250rpm ; 24h	Purificação de FTase	420	L'Hocine et al. (2000)
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC 28811	Sacarose 250g/L	Reactor: pH5,5, 180rpm; 24h	Produção de FOS	NA	Katapodis et al. (2004)

^a Produtividade

NA: não disponível

A maior parte dos microrganismos investigados nesta área (Tabela 3.1) são fungos e pertencem ao género *Aspergillus* (Van Balken et al. 1991; L'Hocine et al. 2000; Chien et al. 2001), *Penicillium* (Dhake and Patil 2007), e *Aureobacterium* (Sangeetha et al. 2003). Apesar de muitos microrganismos produzirem FTase, só alguns têm potencial para serem utilizados na produção industrial e foram indicados nos estudos realizados para a produção de FOS (Yun et al. 1993; Patel et al. 1994; Sangeetha et al. 2005b; Sánchez et al. 2008).

O género *Aspergillus* tem recebido particular atenção e tem sido citada como óptima produtora de enzimas. Os mais utilizados, em programas de investigação em biotecnologia e industrialmente como produtores de enzimas, são o *Aspergillus oryzae* e o *Aspergillus niger*.

A actividade do enzima β -frutofuranosidase obtida a partir do *A. niger* em meios com elevadas concentrações de sacarose é conhecida desde longa data, e este enzima é utilizado nos processos industriais para produzir FOS para o consumo humano.

3. 4.A biomassa e o processo de produção de frutossiltransferase

3.4.1 Processo com erlenmeyers agitados

Como se pode ver na Tabela 3.1 a maior parte da investigação para a produção de FTase está baseada na utilização de erlenmeyers em incubadoras com agitação. O trabalho realizado em biorreactores é utilizado nos estudos em que se pretende a produção e purificação do enzima para produção de FOS, no entanto, as publicações de investigação a nível piloto, só focadas na produção de enzimas, são raras (Maiorano et al. 2008).

As variáveis principais utilizadas para obter as condições óptimas para a produção do enzima têm sido as fontes de carbono e de azoto e suas concentrações. A sacarose é considerada a melhor fonte de carbono para a produção de FTase. As condições óptimas, para a produção de FTase, em relação à utilização de sacarose apresentam um amplo espectro de concentração (Tabela 3.1).

Chen e Liu (1996) referem que as condições óptimas para a produção do enzima são atingidas com 25% (w/v) de sacarose, no entanto, a produção máxima de células

ocorre com 10% de (w/v) de sacarose. Estes autores sugerem que próximo dos 10%, a maior parte da fonte de carbono é utilizada para o crescimento celular, enquanto que a elevada concentração de sacarose está correlacionada com a indução da produção elevada de enzima mas com a inibição do crescimento celular.

Em relação à fonte de azoto, verifica-se que o extracto de levedura e o “corn steep liquor” apresenta efeito positivo na produção da FTase o que não acontece com outras fontes de azoto tais como a ureia, NH_4SO_4 , NaNO_3 e NH_4NO_3 (Wang and Raskit, 1999; Vandáková et al. 2004; Wang and Zhou 2006). A peptona a 5% w/v e o extracto de levedura 5% w/v têm sido a fonte de azoto mais utilizada (Dorta, 2006).

O estado fisiológico de fungos filamentosos pode interferir na produção de enzima. A fonte de azoto influenciou a morfologia do crescimento do *A. foetidus* cultivado em erlenmeyers agitados (Wang and Rashit 1999). O uso de peptona originou a formação de “pellets” com textura fechada, enquanto o extracto de carne conduziu a pellets soltas e expandidas e a utilização de “corn steep liquor” produziu o crescimento de hifas dispersas ou a formação de “pellets” pequenas e soltas. “Pellets” pequenas foram observadas quando foram utilizadas fontes de azoto inorgânico. As “pellets” de massa reduzida e a velocidade de transferência gasosa diminuiriam a produção de enzima. A melhor concentração de “corn steep liquor” para a produção de FTase foi de 3% com maltose como fonte de carbono a 1% w/v.

A produção de FTase pela *A. niger* ATCC 20611 e pela *A. japonicus* FCL 119T, utilizando 3% (w/v) de sacarose como fonte de carbono, foi influenciada pela concentração de peptona. A produção de FTase foi máxima a 3% (w/v) de peptona. Concentrações superiores diminuíram de forma drástica a produção de enzima, contudo o crescimento celular não foi influenciado pela variação da concentração da peptona. Entretanto, a utilização de melão de cana como fonte de carbono foi benéfico para as duas espécies e o uso de extracto de levedura como fonte de azoto originou um crescimento celular superior e numa actividade inferior da FTase, quando comparado com a utilização da peptona. Nestas condições, a concentração óptima de extracto de levedura para a produção de FTase foi de 1,5% (Dorta et al. 2006).

Balasubramaniem et al. (2001) utilizaram um planeamento factorial de experiências para estudar o efeito da variação de várias fontes azoto para produzir FTase por *A. niger* NRRL 330. O planeamento conduziu a um meio otimizado com

elevadas quantidades de azoto a partir de diferentes fontes. Esta investigação aumentou três vezes a produção de FTase.

Os surfactantes e os polímeros, as propriedades reológicas do meio, a fisiologia das células, a disponibilidade de nutrientes e de O₂ podem influenciar a germinação de esporos. A adição de polímeros, tais como o PEG 4000, o PEG 6000, a poliacrilamida, a polivinilpirrolidona e a gelatina influenciaram a morfologia de crescimento dos fungos, diminuindo o crescimento celular e a produção de frutossiltransferase. Por outro lado, a adição de carboximetilcelulose promoveu a produção de enzima (Chen and Liu, 1996; Wang and Zhou 2006). No que diz respeito à reologia da fermentação (Lim et al. (2006) referiram a existência de rotura das “pellets” depois de 48h de fermentação que foi originado pelo aumento da viscosidade do meio fluido e conseqüentemente pela redução de transferência de O₂ para as “pellets”. Os autores concluíram que a produção de neo-FTase a partir do *P. citrinum* é facilitada quando as “pellets” se dividem em pequenos micélios, a existência deste efeito pode ser incrementado pelos parâmetros da fermentação tal como o tipo de fonte de carbono.

Vários investigadores referem o efeito dos sais inorgânicos. K₂HPO₄ é descrito como uma fonte de microelementos para o crescimento celular, bem como um agente tamponante. A sua concentração óptima varia de 4g/L (Sangeetha et al. 2005a, b, c) para 5g/L (Vandáková et al.2004 Lim et al. 2006). O Mg²⁺ afecta a permeabilidade das paredes das células para *A. pullulans* (Vandáková et al.2004) e a sua concentração óptima varia de 0,3g/L (Sangeetha e tal 2005a, b, c) para 2g/L (Balasubramaniem et al. 2001). Vandáková et al. (2004) mostraram que a produção mais elevada de FTase para *Aureosidium pullulans* se atingiu com um meio contendo 5g de K₂HPO₄/L, 10g NaNO₃/L e 0,5gMgSO₄.7H₂O/L.

O pH do meio tem muita importância na produção FTase e no crescimento dos microrganismos. Para obter elevada produção de FTase em erlenmeyers agitados por *P. purpurogenum* (Dhake and Patil 2007), *Aspergillus oryzae* CFR202 (Sangeetha et al. 2005a, b, c) e por *A. japonicus* (Wang and Zhou 2006) o pH escolhido foi 5,5. Wang and Rashit (1999) estudaram o efeito do pH na produção de FTase em biorreactor para o *A. foetidus* NRRL 330. O pH foi controlado a 4,0, 5,0 e 6,0 por comparação com pH inicial de 6,0 não controlado. Os resultados indicaram que o pH da fermentação não controlada produziu a actividade enzimática mais elevada.

Sangeetha et al. (2005a) testaram a reciclagem de culturas para produção de FTase por *A. oryzae* CFR202. As “pellets” obtidas em erlenmeyers agitados depois de incubação durante 48h foram separadas por decantação e suplementados com meio fresco. Este novo caldo, ao fim de cada 24h de incubação, foi decantado e substituído por meio fresco. Os autores concluíram que a produtividade da FTase foi mantida constante até seis reciclagens, a partir daí verificou-se uma diminuição da FTase resultante da desintegração da “pellets”. A FTase obtida a partir de cada ciclo foi utilizada para a produção de FOS e o rendimento de 53% foi constante durante os seis ciclos.

Yun et al. (1997) conseguiram um aumento de produção de FTase com a utilização de uma cultura semi-contínua com *Aureobasidium pullulans*. Um pulso de sacarose a cada 36 horas resultou num aumento de 35% da produção de FTase quando comparado com o processo descontínuo.

3.4.2 Produção de frutossiltransferase em biorreactor

Poucos trabalhos existem acerca do efeito do arejamento e agitação e aumento de escala na produção de FTase. Wang e Rakshit (1999) compararam a produção de FTase por *A. foetidus* em erlenmeyers agitados e em reactores de diferentes tamanhos. Num biorreactor de 1L com 0,5L de meio de cultura com agitador magnético e arejamento 0,1vvm, foi conseguido um aumento de 4 vezes a actividade de FTase, quando comparado com a actividade obtida em erlenmeyers agitados. Além disso, devido à elevada viscosidade do caldo produzida pelos micélios dispersos, foi conseguido um aumento de transferência de massa nos biorreactores agitados. O aumento de escala do fermentador, 10L com 3,5L de meio de cultura, tendo um agitador com pás Rushton, originou o dobro da produção da actividade enzimática quando comparada ao reactor de 1L.

O efeito da agitação e do arejamento foi, também, objecto da investigação para a produção da neo-FTase por *P. citrinum* (Lim et al. 2006). As experiências foram levadas a efeito em biorreactores de 2,5L a diferentes velocidades de agitação (200 – 600 rpm) e com velocidades de arejamento entre 0,5 – 2,5 vvm. A produção máxima de biomassa e de enzima foi conseguida a 500 rpm. O efeito da agitação foi superior ao

efeito do arejamento. O valor óptimo para a velocidade de arejamento para a produção de biomassa e de enzima foi 1,5vvm.

Barbosa (2007) conduziu um planeamento experimental no sentido de otimizar a temperatura, a agitação e o arejamento. As experiências foram planeadas num fermentador de 3L com 2,2L de meio de cultura, utilizando um agitador de pás. A produção máxima de enzima foi obtida a 32°C, a 500rpm e a 2,5vvm de velocidade de arejamento.

Estudos conducentes, a um aumento de escala e de viabilidade económica, foram realizados para a produção de FTase purificada, utilizando o processo descontínuo com *Aureobasidium pullulans* (Vandáková et al. 2004). Uma fábrica foi projectada para uma produção anual de 80kg de enzima seca e com uma actividade de 1 143 000 U/g e contendo 28,4% de FTase. O custo total do investimento foi de 11,4 milhões de €. O custo total de equipamento foi 2,6 milhões de € em que os dois biorreactores e as colunas cromatográficas absorveram 1/3 do custo do equipamento total. O preço da matéria-prima foi calculada em 5,1 milhões de € e constituiu 63% do custo operacional anual. Se o preço da FTase for 200€/g o tempo de amortização do investimento é de 2 anos. Um preço inferior aumenta consideravelmente o tempo de pagamento de retorno e o investimento deixa de ser favorável.

3.4.3 Considerações e tendências futuras

Durante as últimas décadas, o desenvolvimento e o consumo de produtos pré-bióticos tiveram um aumento muito rápido. De entre estes novos produtos disponíveis comercialmente, os fruto-oligossacáridos (FOS) obtidos a partir de sacarose, têm tido uma especial atenção devido às suas propriedades e, assim, têm um potencial económico para os resíduos da indústria do açúcar e de outros resíduos agro-industriais.

Do ponto de vista da grande procura de FOS, a sua produção a partir da acção da frutotransferase na sacarose e a sua obtenção têm originado um enorme interesse na área da investigação e da indústria. Assim há um grande interesse no levantamento de novos microrganismos para a produção de FFase. O desenvolvimento de métodos

rápidos para identificação de microrganismos aliado às técnicas baseadas no DNA recombinante permite obter novas espécies de mais elevada produtividade.

Além disso, o pouco trabalho publicado na área da investigação quer ao nível da produção em bio-reactores quer ao nível do aumento de escala permite-nos afirmar que estudos neste enfoque são de muito interesse. A optimização dos factores de funcionamento e outros aspectos de engenharia bioquímica para melhorar os meios de cultura, reciclagem de células, os processos de separação, a purificação e sequestração de enzimas são aspectos que contribuirão para a viabilidade económica da produção da FTase.

4. Metodologia

Objectivos a atingir:

1. Caracterizar duas estirpes de *Saccharomyces*, variando a fonte de carbono, a temperatura e o pH.
2. Determinar a concentração em biomassa, em sacarose 20% suplementada com resíduos agro-industriais, mantendo a temperatura e o pH.
3. Avaliar ao longo do tempo os glúcidos e os fruto-oligossacáridos produzidos pelas estirpes de *Saccharomyces*.
4. Determinar a concentração de fruto-oligossacáridos por outros microrganismos: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.

4.1. Microrganismos

Foram utilizados os seguintes microrganismos:

- duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, uma da Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais (CCMI) do INETI, com o número 396 e outra, uma levedura vínica da Coleção do Laboratório e em estudo, designada por v. lab.
- quatro estirpes fúngicas, da Coleção de Microrganismos Industriais (CCMI) do INETI:
 - *Aspergillus oryzae* CCMI 125;
 - *Aspergillus japonicus* CCMI 443;
 - *Aspergillus niger* CCMI 296;
 - *Fusarium oxysporum* CCMI 866.

4.2. Estirpes *S. cerevisiae*

As estirpes foram mantidas em rampas de YPD a 4°C, com repicagens trimestrais.

O meio sólido de crescimento/manutenção foi preparado de acordo com a tabela.

Extracto de levedura	10 g/L
Bactopeptona	10 g/L
Dextrose	20 g/L
Agar	20 g/L

O meio foi colocado em banho até dissolução completa do Agar. Quando translúcido, foi colocado em frascos de vidro e esterilizado em autoclave durante 20 minutos.

Os inóculos foram preparados a partir de rampas frescas, incubadas a 30°C durante 48 h. Cada rampa foi arrastada com meio líquido para um erlenmeyer que continha 100 mL de meio de cultura. O crescimento ocorreu num agitador orbital a 30 °C e 200 rpm.

Na primeira parte do trabalho experimental, após 24 h de crescimento, 10% (v/v) da cultura foi utilizada para inocular 200 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 500 mL, sujeito às mesmas condições de agitação, variando a temperatura e o valor de pH inicial, de fermentação para fermentação.

A cultura decorreu durante 24 horas.

Na segunda parte do trabalho as condições de cultura foram: 100 mL de meio em erlenmeyers de 500 mL, a 30 °C, a 100 rpm durante 24 horas.

4.2.1. Meio de cultura utilizado na caracterização das estirpes de *Saccharomyces*

O meio de cultura utilizado no crescimento era composto por (Tabela 4.1):

Tabela 4.1- Composição do meio de cultura (adaptado de Yuan, J.Q. et al, 1993)

Solução de minerais	Ácido cítrico (0,01 g/L)
	MnSO ₄ . H ₂ O (0,0119 g/L)
	CuCl ₂ . 2H ₂ O (0,000017 g/L)
	FeSO ₄ . 7H ₂ O (0,01 g/L)
	Na ₂ MoO ₄ (0,0108 g/L)
	NiCl ₂ . 6H ₂ O (0,000044 g/L)
Solução de Cálcio	CaCl ₂ . 2H ₂ O (0,42 g/L)
Solução de Sulfato de magnésio	MgSO ₄ . 7H ₂ O (0,45 g/L)
Solução de Cloreto de potássio	KCl (0,98 g/L)
Solução NP (pH=5, acertar com NaOH 5 M)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (4,5 g/L)
	NH ₄ H ₂ PO ₄ (3,315 g/L)
Solução de Vitaminas I	m-inositol (0,005 g/L)
	Pantetonato de cálcio (0,0025 g/L)
	Hidrocloreto de tiamina (0,0005 g/L)
Solução de Vitaminas II	Biotina (0,0000025g/L)
	Hidrocloreto de piridoxina (0,0000125 g/L)
Solução da fonte de carbono	Glucose (30g/L)
	Maltose (30g/L)
	Sacarose (30g/L)

Na preparação de 1 L de meio de cultura foram utilizados os seguintes volumes de cada uma das soluções:

Tabela 4.2 – Preparação de um litro de meio de cultura.

Solução	Volume
Solução de minerais	25 mL
Solução de cálcio	10 mL
Solução de sulfato de magnésio	25 mL
Solução de cloreto de potássio	25 mL
Solução NP	40 mL
Solução de vitaminas I	10 mL ^(*)
Solução de vitaminas II	2 mL ^(**)
Solução de glucose	863 mL

(*) medir 10 µL de solução de vitaminas I e adicionar 9,99 mL de H₂O.

(**) medir 20 µL de solução de vitaminas II e adicionar 1,98 mL de H₂O.

4.2.2. Meio de cultura utilizado na avaliação de glúcidos produzidos pelas estirpes de *Saccharomyces*.

O meio utilizado nas restantes culturas, foi um meio líquido com Sacarose a 20 % g/L (Tabela 4.3):

Tabela 4.3 – Constituição de meios (Cerqueira, 2005 e Dorta, C et al., 2006)

	Meio I	Meio II	Meio III
Sacarose	200 g	200 g	200 g
Extracto de levedura	10 g	10 g	10 g
Extracto de peptona	10 g	10 g	10 g
	Água	Sumo de laranja (80%)	Sumo de tomate (80%)

4.3. Estirpes fúngicas

4.3.1. Crescimento das culturas

Cada estirpe de fungo mantida em meio sólido MEA foi inoculada em 100mL de meio de cultura líquido SAC 2% (20g/L de sacarose, 10g/L extracto de levedura e 10g/L extracto de malte) (Cerqueira et al., 2007). Após o crescimento das culturas a 30°C durante 48h, transferiram-se 10% das culturas pré-inoculo para 100mL de meio SAC 20% em erlenmeyers de 500mL. Foram recolhidas amostras de 2mL em intervalos de 24h durante 7 dias de cultura. Realizaram-se duplicados das culturas para cada estirpe.

4.3.2. Preparação das amostras

Após serem recolhidas as amostras foram centrifugadas a 13000g durante 20min. Posteriormente recolheu-se o sobrenadante (extracto extracelular) que foi guardado a -20°C no congelador. No final das culturas, estas foram filtradas separando-se assim o extracto extracelular dos agregados celulares formados. As células foram lavadas com soro fisiológico e novamente filtradas. Por fim as células foram ressuspensas em tampão acetato de sódio 0,01M pH 5,0. Posteriormente procedeu-se à lise das células em tampão por ultra-sons. Seguidamente as células lisadas foram centrifugadas a

15000g durante 10min. O sedimento foi eliminado e recolheu-se o sobrenadante (extracto intracelular) que foi posteriormente guardado a -20°C no congelador.

4.4.Métodos analíticos

4.4.1.Métodos analíticos utilizados no trabalho desenvolvido com as estirpes de *S. cerevisiae*

4.4.1.1.Leitura da absorvância

O crescimento das leveduras foi avaliado através da absorvância. Durante as culturas foram retiradas amostras de 1 mL e determinada a sua absorvância a 600 nm.

4.4.1.2.Determinação da concentração em biomassa

Na primeira parte do trabalho, foram, periodicamente, retirados e filtrados em sistema de vácuo 5 mL de cada cultura utilizando para o efeito filtros estéreis. Os filtrados foram colocados durante 24 horas a 80 °C na estufa. Depois de arrefecidos em exsiccador foi determinado o peso seco de cada amostra.

Nas restantes fases, a determinação do peso seco foi realizada da seguinte forma:

- 1 - Centrifugar 1,0 mL de cultura em tubos eppendorf secos e tarados a 13000g, durante 10min.
- 2 - Lavar duas vezes o pellet com 1,0 mL de água filtrada.
- 3 - Secar os tubos com a respectiva biomassa numa estufa a 80°C, arrefecer no exsiccador e pesar numa balança analítica.

De forma a obter uma correlação entre absorvância e o peso seco da levedura, prepararam-se uma série de soluções celulares de diferentes concentrações a partir de uma solução mãe feita a partir dos inóculos de *S. cerevisiae* 396 e *S. cerevisiae v.lab*. Foram lidas as absorvâncias destas soluções e determinaram-se os respectivos pesos secos. Com estes dados calculou-se a respectiva correlação linear e através desta e das absorvâncias lidas no ponto 4.4.1.1. chegaram-se aos pesos secos das culturas.

4.4.1.3.Determinação da taxa de crescimento específica

A curva de crescimento foi obtida através da representação gráfica do logaritmo neperiano dos valores de absorvência em função do tempo. Posteriormente, foi determinada a taxa de crescimento específica, através do declive da recta obtida na representação da fase exponencial de crescimento.

4.4.1.4.Quantificação de Glucose

O doseamento do açúcar redutor (glucose) foi realizado pelo método do Ácido dinitrosalicílico (DNS).

As amostras recolhidas ao longo das culturas foram centrifugadas nas seguintes condições: 16000 g, 4°C e 25 minutos. A glucose foi doseada no sobrenadante obtido pelo processo de centrifugação.

Preparação do reagente DNS

Prepararam-se 500 mL de reagentes DNS, dissolvendo-se 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH 2 M a quente e com agitação. À parte dissolveram-se 150 g de tartarato de sódio e potássio (sal de La Rochelle) em 250 de água destilada. De seguida, misturou-se tudo, transferindo-se para um balão volumétrico de 500 mL e perfazendo-se o volume com água destilada.

A solução obtida foi guardada num frasco escuro no frio.

Curva de calibração

Para determinação das amostras, foi construída uma curva de calibração (Anexo B) de acordo com a tabela 4.4. A reacção decorreu a 100 °C numa rampa de aquecimento durante 5 minutos. Findo este tempo, parou-se a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo. De seguida, adicionou-se a cada tubo 5 mL de água destilada e leu-se a absorvência a 540 nm. As amostras e os padrões foram lidas contra um branco que continha volumes equivalentes de água e reagente DNS.

As determinações foram efectuadas em duplicado.

Tabela 4.4 – Preparação das soluções-padrão.

Tubo de ensaio	I	II	III	IV	V	VI	VII
[Padrões] g/L	0	0,125	0,250	0,500	0,750	1,000	1,250
Sol. mãe de glucose (μ L)	-	50	100	200	300	400	
H ₂ O (μ L)	500	450	400	300	200	100	
DNS (μ L)	500	500	500	500	500	500	500

4.4.1.5. Avaliação ao longo do tempo dos glúcidos produzidos pelas estirpes de *Saccharomyces*

Construíram-se curvas de calibração com padrões dos compostos, nistose (GF₃) e l-cestose (GF₂), por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, com detector de índice de refração para detectar os FOS nas culturas desenvolvidas.

4.4.1.6. Determinação do enzima frutossiltransferase

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas da seguinte forma:

1. Centrifugar a 13000g e separar o sobrenadante (amostra extracelular) da fracção de células.
2. Ressuspender as células em tampão acetato de sódio 0,01M; pH 5,0 e centrifugar a 13000g, repetir duas vezes. Desintegrar as células em tampão através de um aparelho de ultra-som. Centrifugar a 15000g e guardar o sobrenadante (amostra intracelular).

Determinação da concentração de frutossiltransferase (E.C. 2.4.1.9)

O doseamento de frutossiltransferase de acordo com Hang, Y. D. (1995):

1 – Adicionar em tubos de ensaio:

- 1700 μL – Sacarose 0,3M em tampão acetato de sódio 0,01M; pH 5.0
 - 300 μL – Sobrenadante da cultura
- } Volume total = 2 mL

2 – Colocar os tubos no banho a 40°C durante 60 minutos.

3 – Terminar a reacção com o aumento da temperatura 5 minutos a 100°C.

Seguido da determinação de glucose nas amostras intra e extracelulares através de kit enzimático.

4.4.2. Métodos analíticos utilizados no trabalho desenvolvido com as estirpes fúngicas

4.4.2.1. Ensaio enzimático da frutofuranosidase (FFase) / Produção de FOS

A actividade da FFase foi determinada, através da quantificação de glucose produzida a partir da sacarose (Yoshikawa et al., 2006; Mussatto et al., 2008; Hang, Y.D. et al., 1995).

Mistura reaccional (volume total = 2mL):

- 1500 μL de Sacarose 0,3M em tampão acetato de sódio 0,01M pH 5.0
- 500 μL de extracto enzimático

Tubos devidamente identificados foram colocados em banho de água a 40°C com agitação. Recolheram-se os tubos após a primeira hora de reacção e depois em intervalos de 3 horas. Posteriormente foram transferidos para uma rampa de aquecimento a 100°C durante 15 min para que a reacção fosse terminada. Uma unidade (U) de actividade de FFase é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de glucose por minuto.

4.4.2.2.Separação dos açúcares por TLC

Foram preparadas soluções padrão de Glucose 5%, Sacarose 5%, Frutose 5% e FOS 5%. Aplicaram-se 5 µL de cada solução padrão e das amostras numa placa de TLC em sílica gel 60. Utilizou-se uma solução de clorofórmio, metanol e água na proporção de 6:4:1 como fase móvel. Procedeu-se à revelação dos cromatogramas por imersão dos mesmos numa solução reveladora (10,5mL de solução de α -1-naftol a 15% (p/v) em etanol; 6,5mL de H₂SO₄ concentrado 97%; 40,5mL de etanol e 4mL de água), retirando-os imediatamente e de seguida coloca-los na estufa a 100°C. Após alguns minutos observa-se a formação de manchas de cor castanha.

4.4.2.3.Quantificação da glucose através de um kit enzimático (Sigma)

Determinou-se a quantidade de glucose (mg) presente nas amostras extra e intracelulares das quatro estirpes fúngicas, utilizando um kit enzimático.

4.4.2.4.Quantificação da produção de FOS (1-Cestose e 1-Nistose) e dos açúcares residuais (Sacarose, Glucose e Frutose) por HPLC.

Utilizou-se uma mistura de acetonitrilo : água Mili Q (75/25 v/v) como fase móvel num fluxo de 1,0mL/min. Todas as amostras foram filtradas antes da injeção no aparelho através de filtros de 0,45µm. As concentrações de FOS e açúcares redutores foram determinadas a partir das curvas de calibração realizadas para cada um dos compostos. A quantidade total de FOS é calculada pela razão entre a soma das concentrações de 1-Cestose e 1-Nistose e a concentração inicial de Sacarose (Mussatto et al., 2008).

5. Resultados e Tratamento de Resultados

5.1. Caracterização de duas estirpes de *Saccharomyces*, variando a fonte de carbono, a temperatura e o pH.

No sentido de analisarmos o crescimento da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* CMMI 396 e da *Saccharomyces cerevisiae*, somente designada por v. lab., pertencente à colecção do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química, realizaram-se várias fermentações com meios de cultura diferentes e diferentes condições ambientais (Tabela 5.1.). Os ensaios foram idênticos para as duas estirpes.

Tabela 5.1 – Fontes de carbono e condições ambientais experimentadas.

	Substrato de carbono	Temperatura	pH	NaCl
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CMMI 396	Glucose, 30 g/L	30°C	4	-
	Glucose, 30 g/L	30°C	5	-
	Glucose, 30 g/L	35°C	5	-
	Glucose, 30g/L	30°C	5	+
	Maltose, 30g/L	30°C	5	-
	Maltose, 30g/L	30°C	5	+
	Sacarose, 30g/L	30°C	5	-
	Sacarose, 30g/L	30°C	5	+
	Sacarose, 30g/L	35°C	5	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> v. lab.	Glucose, 30 g/L	30°C	5	-
	Glucose, 30 g/L	35°C	5	-
	Glucose, 30g/L	35°C	5	+
	Maltose, 30g/L	35°C	5	-
	Maltose, 30g/L	35°C	5	+
	Sacarose, 30g/L	30°C	5	-
	Sacarose, 30g/L	30°C	5	+
	Sacarose, 30g/L	35°C	5	-

(+) com adição de Cloreto de sódio; (-) sem adição de Cloreto de sódio

Os resultados obtidos permitiram avaliar vários parâmetros específicos relativamente às duas estirpes consideradas. Estes resultados encontram-se no Anexo A. Os valores obtidos pela *Saccharomyces cerevisiae* CMMI 396, quando se utilizou, como

fonte de carbono, a glucose a 30g/L, 30°C e pH = 5, foram superiores a todas as outras fermentações. Assim passaremos a analisar os resultados referentes a esta fermentação.

5.1.1. Estirpe *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396

Os dados obtidos das fermentações da *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 no meio de cultura definido, somente variando a fonte de carbono e as condições ambientais utilizados apresentam-se no Anexo A, Tabela A1.

Esta estirpe, utilizando como fonte de carbono a glucose, apresentou uma fase de arranque de aproximadamente 1 hora e um crescimento exponencial das 3 até às 8h seguindo-se uma zona de desaceleração do crescimento e uma zona estacionária até ao tempo observado, 24h (Figura 5.1).

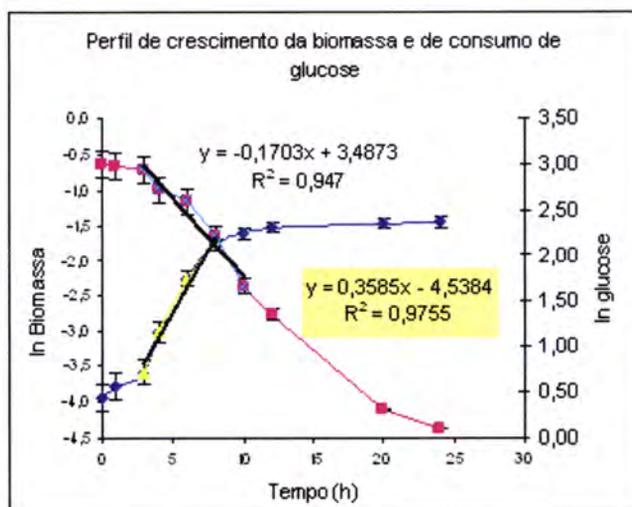


Figura 5.1-Perfil da curva logaritmica de crescimento e de consumo de glucose obtida para *S. cerevisiae* CCMI 396 em meio de cultura contendo glucose, à temperatura de 30 °C e a pH = 5, com dados referentes à fase exponencial.

A velocidade específica de crescimento foi de $0,36 \text{ h}^{-1}$, Figura 5.1. A cultura cresceu rapidamente nas primeiras horas, sendo a fase de latência curta, inferior a 1 hora. A velocidade específica de consumo de glucose foi de $0,17 \text{ h}^{-1}$. Atendendo ao elevado crescimento da cultura durante as primeiras horas, a concentração de glucose diminuiu acentuadamente.

O cálculo da biomassa durante a fermentação foi avaliado quer medindo a densidade óptica quer medindo o peso seco

Verifica-se uma linearidade elevada quer em relação ao crescimento da biomassa quer em relação ao consumo da glucose, podendo-se considerar que a velocidade de crescimento da biomassa é de 0,026g/Lh na zona exponencial e que a velocidade de consumo da glucose é de 1,823g glucose/Lh na zona exponencial de crescimento da biomassa, resultando num rendimento de 0,012 g de biomassa produzida por grama de glucose consumida.

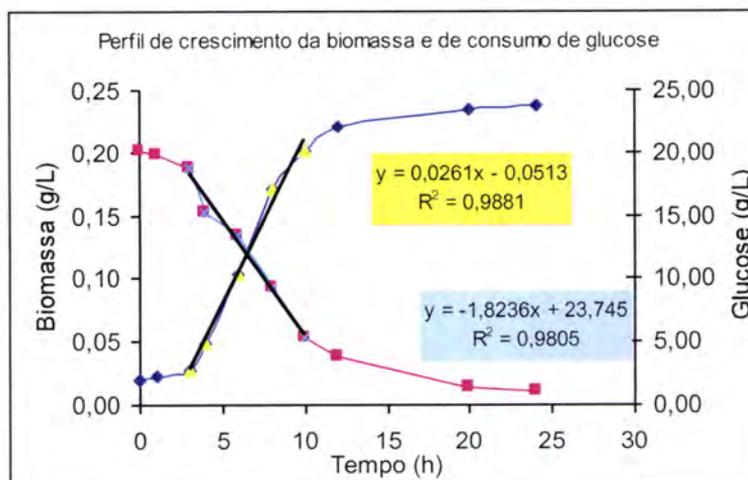


Figura 5.2 – Perfil de crescimento obtido e o perfil de consumo de glucose para a *S. cerevisiae* 396, a 30 °C e pH =5.

Realizaram-se outras culturas utilizando diferentes fontes de carbono, temperaturas e valores de pH, os resultados obtidos encontram-se em anexo (Anexo A).

5.1.2. Estirpe *Saccharomyces cerevisiae* v. lab.

Igual estudo decorreu para a estirpe vínica designada por *S. cerevisiae* v. lab.

Esta estirpe, utilizando como fonte de carbono a glucose, apresentou uma fase de arranque de aproximadamente 1 hora e um crescimento exponencial das 3 até às 10h, seguindo-se uma zona de desaceleração do crescimento seguida de uma curta zona de crescimento com posterior decréscimo até ao tempo observado, 50 h, Figura 5.3.

O comportamento desta estirpe foi diferente da *S. c.* CCMI 396, um período mais longo na zona exponencial e uma zona estacionária não definida.

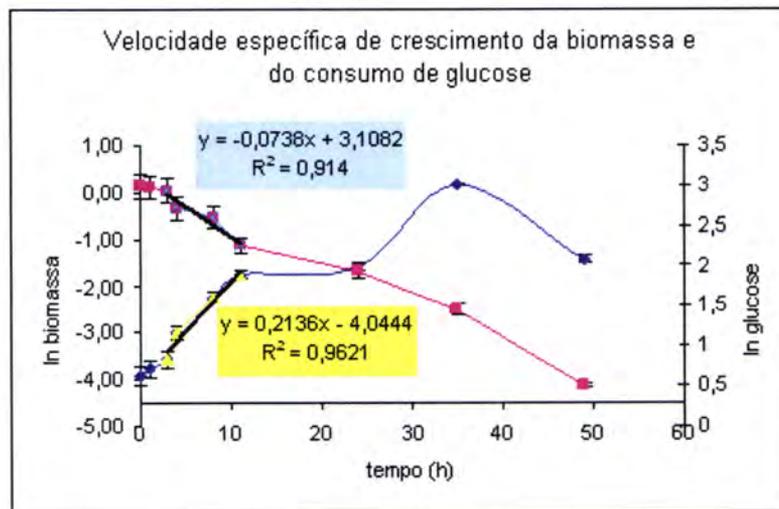


Figura 5.3 - Perfil da curva de crescimento logarítmica obtida para *S. cerevisiae* v. lab. em meio de cultura contendo glucose, à temperatura de 30 °C e a pH = 5.

O valor médio da velocidade específica de crescimento obtido foi de $0,21h^{-1}$, e a velocidade específica de consumo de glucose foi de $0,074h^{-1}$. Verifica-se que a cultura cresceu rapidamente nas primeiras horas, sendo a fase de latência curta, praticamente inexistente.

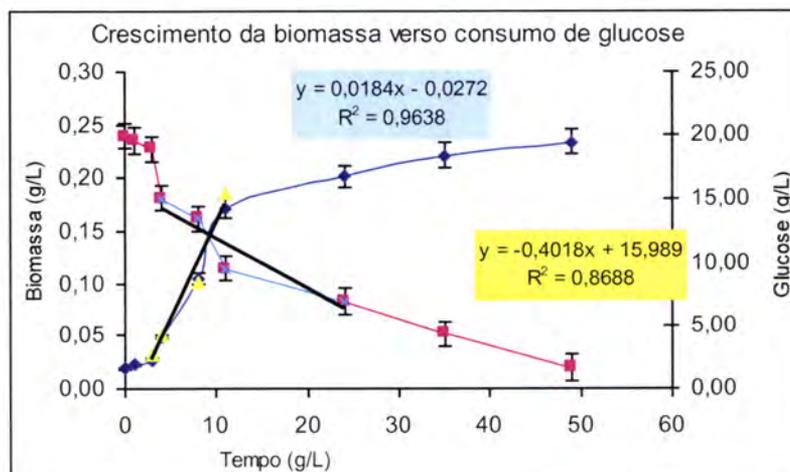


Figura 5.4 – Perfil das curvas de crescimento da *S. cerevisiae* v. lab., e de consumo de glucose, a 30°C e pH=5.

Os valores da produtividade e do consumo da glucose durante a zona exponencial de crescimento foram 0,018 g/Lh e 0,4 g/Lh respectivamente, resultando na zona exponencial um rendimento de 0,045 g de biomassa por grama de glucose consumida.

Com as outras fontes de carbono, o perfil da *S. cerevisiae* 396 foi idêntico, no entanto para *S. cerevisiae* v. lab. o tempo de cultura não foi o suficiente para o consumo da fonte de carbono. O período de arranque e de crescimento exponencial foi muito mais longo, o que dificultou comparações, no entanto, os resultados levam-nos a ter em conta posteriores experiências.

5.2. Determinação da concentração em biomassa, em sacarose 20% suplementada com resíduos agro-industriais, mantendo a temperatura e o pH.

De acordo com o descrito no ponto 4.4.1, procedeu-se à determinação da concentração de biomassa, Anexo B, verificando-se que houve velocidade específica de crescimento maior no meio de sacarose 20% + 80% de sumo de tomate, 0,199 h⁻¹ para a estirpe v. lab. 1,967 h⁻¹ e 0,365 h⁻¹ para a *S.c.*396 (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Velocidade específica de crescimento das estirpes estudadas em sacarose 20% suplementada com sumo de laranja e sumo de tomate.

Estirpe	Meio (sacarose 20%)	μ (h ⁻¹)
v. lab.	Água	0,246
v. lab.	80% laranja	0,295
v. lab.	80% tomate	1,967
396	Água	0,255
396	80% laranja	0,283
396	80% tomate	0,365

A velocidade específica de crescimento foi mais elevada para a *S. cerevisiae* v. lab. no meio suplementado com tomate, $1,967 \text{ h}^{-1}$.

Verificou-se que o meio suplementado com sumo de tomate obteve a produtividade mais elevada, 1,9 e 1,8 g/Lh para as estirpes *S. cerevisiae* v. lab e CCMI396, respectivamente (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Dados de produtividade obtidos nas culturas das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de cultura suplementados com sumo de laranja e sumo de tomate.

Velocidade de produção obtidas, r_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)			
Estirpe / (20% sacarose + ...)	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2	Média
v. lab (água)	0,6250	0,6750	0,6500
v. lab (80% de sumo de laranja)	0,7750	0,8500	0,8125
v. lab (80% de sumo tomate)	1,9667	1,8583	1,9125
396 (água)	0,6250	0,7500	0,6875
396 (80% de sumo de laranja)	0,7500	0,6550	0,7500
396 (80% de sumo de tomate)	1,8417	1,9167	1,8792

5.3. Cultura em biorreactor da *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com sumo de laranja, à temperatura 30°C e pH=5.

Para a estirpe *S. cerevisiae* CCMI 396 realizou-se, também, uma cultura em fermentador de 2L, cujos resultados se encontram em anexo, Anexo C. As condições de cultura foram: 1500 mL de meio em fermentador (sacarose 20% e 80% de sumo de laranja), à temperatura de 30°C, pH = 5, 100 rpm e 1vvm durante 28 horas. O valor da velocidade de específica de crescimento foi de $0,251 \text{ h}^{-1}$.

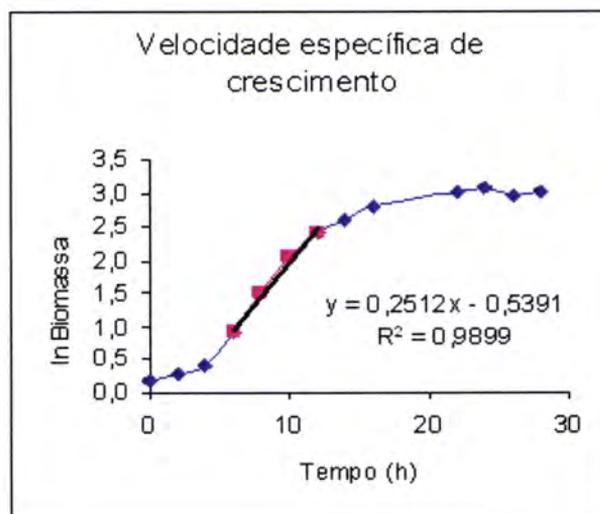


Figura 5.5- Perfil da curva logarítmica do crescimento *S. c.* CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com 80% de laranja.

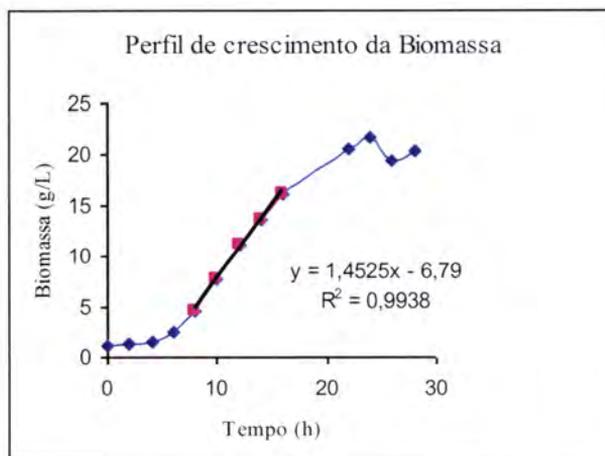


Figura 5.6 - Perfil da curva do crescimento da *S. c.* CCMI 396 em sacarose 20% suplementada com 80% de laranja.

5.4. Avaliação ao longo do tempo dos glúcidos produzidos pelas estirpes de *Saccharomyces*.

Através da técnica de HPLC avaliou-se a presença nas culturas de glúcidos: glucose, frutose e sacarose, assim como, a produção dos fruto-oligossacáridos, Nistose e 1-Cestose.

Para a determinação destes compostos construíram-se curvas de calibração padrão destes compostos, apresenta-se como exemplo a Curva de Calibração da Nistose (Figura 5.7).

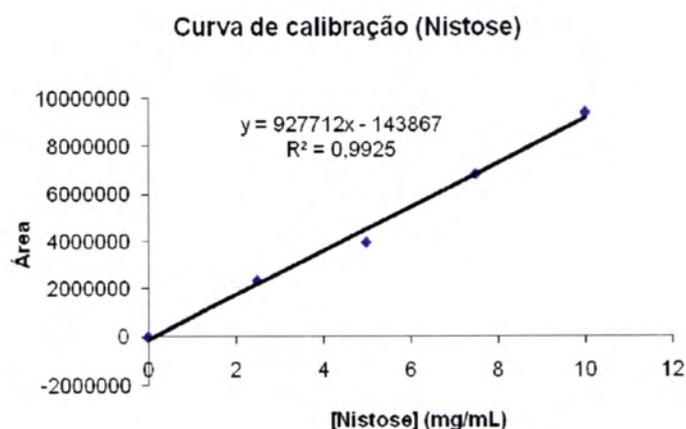


Figura 5.7 – Curva de Calibração Padrão da Nistose.

Analisaram-se os tempos de retenção de cada dos glúcidos, Glucose, Frutose,

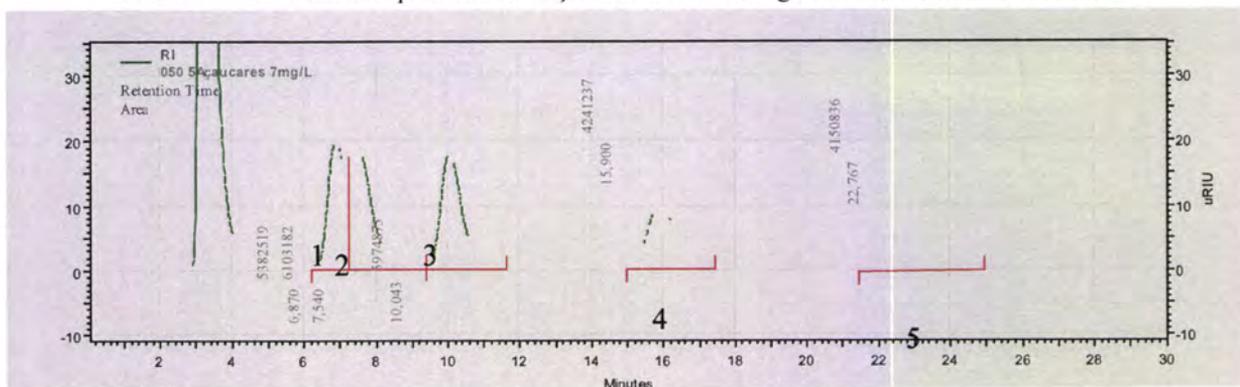


Figura 5.8 – Cromatograma da Frutose (1), Glucose (2), Sacarose (3), 1-Cestose (4) e Nistose (5).

Sacarose, Nistose e 1-Cestose e construiu-se posteriormente o cromatograma que se apresenta na Figura 5.8.

Nas culturas desenvolvidas foram encontrados níveis muito baixos de FOS, como se pode observar pelo cromatograma, Figura 5.9 e pela representação gráfica da concentração mássica de açúcar, mg/L, em função do tempo de cultura, Figura 5.10. Os outros resultados referentes aos meios Água e 80% de Sumo de laranja encontram-se em anexo, Anexo D.

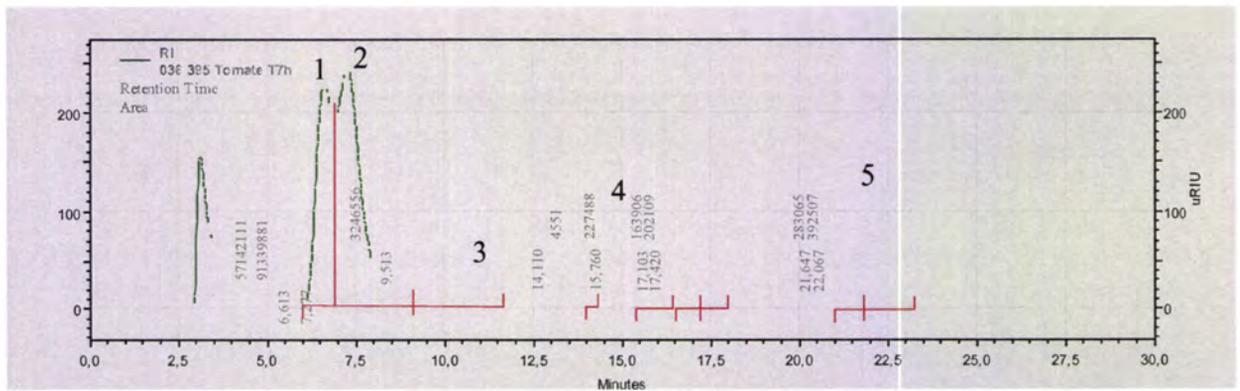


Figura 5.9 – Cromatograma referente à cultura em meio de sacarose 20% e 80% Sumo de tomate com tempo de cultura de 7 horas, (1-Frutose, 2-Glucose, 3-Sacarose, 4-Icestose; 5-Nistose).

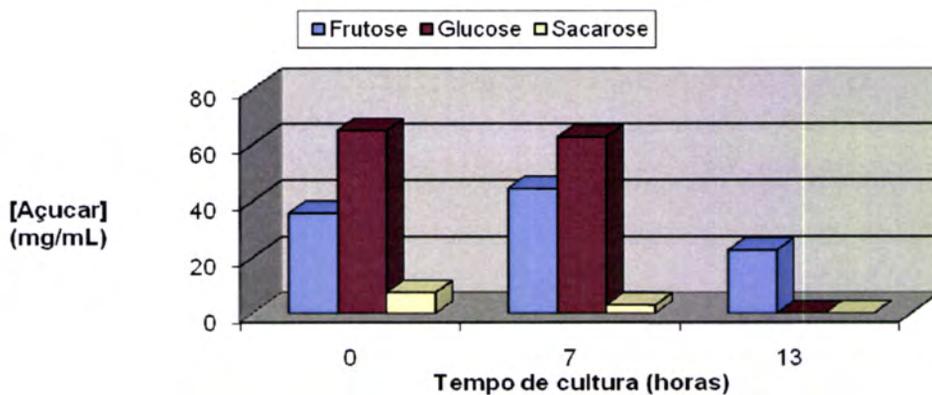


Figura 5.10 – Concentração de frutose, glucose e sacarose em função do tempo, existente na cultura em meio de sacarose 20% e 80% Sumo de tomate.

Resultados semelhantes foram obtidos com os outros meios e também para a outra estirpe, *S. c. v. lab.*

Analisando o cromatograma (Figura 5.11) verificou-se que não houve produção do enzima FTase. Determinou-se, também, a quantificação da glucose produzida por acção da FTase no ensaio com a sacarose. A acção foi nula, Anexo D.

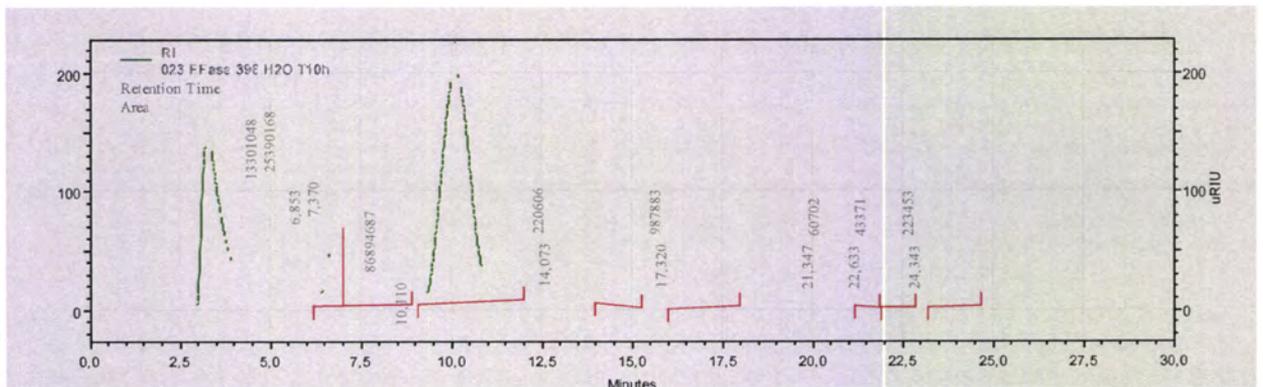


Figura 5.11 – Determinação de FTase na cultura de *s. cerevisiae* 396 em sacarose 20% e tempo de cultura de 10 h.

A Figura 5.12 ilustra como variou no tempo o consumo da sacarose e como os outros glúcidos evoluíram ao longo do tempo de cultura em que a sacarose foi totalmente consumida.

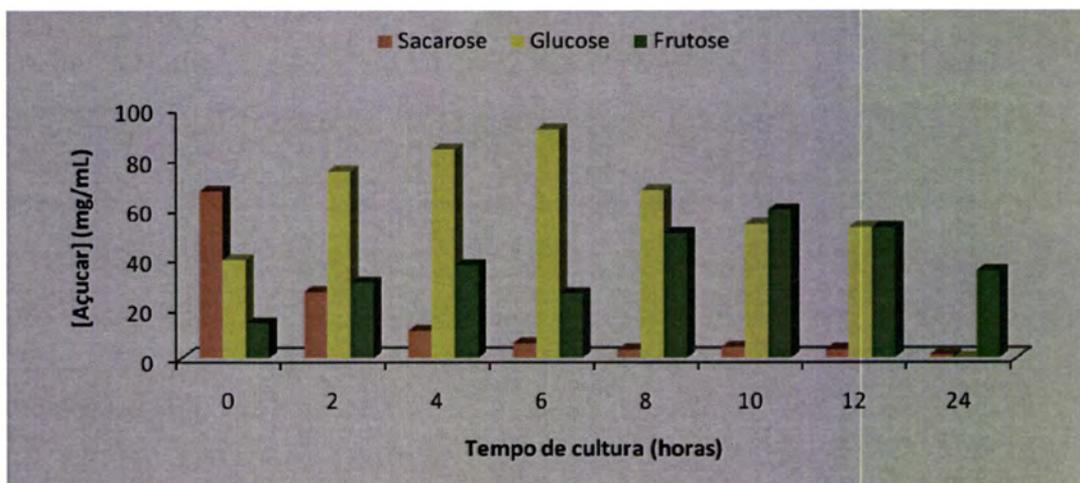


Figura 5.12 – Concentração de açúcar em função do tempo de cultura para *S. cerevisiae* 396 em sacarose 20% e água.

Para além da actividade enzimática da FTase podem interferir outros enzimas que fazem parte da via metabólica Glicólise.

5.5. Cultura de fungos filamentosos e avaliação da acção do enzima FFase na produção de fruto-oligossacáridos, a partir de sacarose.

5.5.1. Morfologia das células fúngicas

As estirpes dos fungos indicados foram obtidas da colecção de microrganismos do ex-laboratório de Microbiologia do INETI. Cada estirpe foi inoculada em 100 mL de meio de cultura líquida com sacarose a 2%, 20g/L de sacarose, 10g/L de extracto de levedura e 10g/L de malte. Após o crescimento das culturas a 30°C durante 48h, transferiram-se 10% das culturas do pré-inóculo para 100 mL de meio 20% sacarose para erlenmeyers de 500 mL, as culturas realizaram-se em duplicado.

O crescimento, das quatro estirpes de fungos, foi seguido quer pelo seu aspecto visual quer por amostragem diária. Foram recolhidas amostras de 2mL em intervalos de 24h durante 7 dias de cultura. Realizam-se duplicados de cada estirpe. Em relação ao aspecto visual foram tiradas fotografias ao natural e com ampliação de 8x, 10x e 40x, Figura 5.13.

A ampliação permitiu verificar que as culturas apresentavam o aspecto esperado e que não estavam contaminadas. A morfologia visual das “pellets”, acompanhada de outros testes reológicos, é da maior importância quando se quer passar da fermentação laboratorial para nível piloto e, até, para industrial. O tamanho das “pellets” desenvolvido pelos diferentes fungos foi diferente. A fonte de azoto, do meio de cultura utilizada, foi a peptona, fonte de azoto que favorece a morfologia do crescimento de fungos em “pellets” com textura fechada (Wang and Rashit 1999). O conhecimento dos diferentes tamanhos das “pellets” desenvolvidos permitirão planear o melhor sistema fermentativo para os desenvolver, aumentar a velocidade de transferência gasosa e adequar o processo de agitação, se só por arejamento ou por arejamento e acção mecânica.

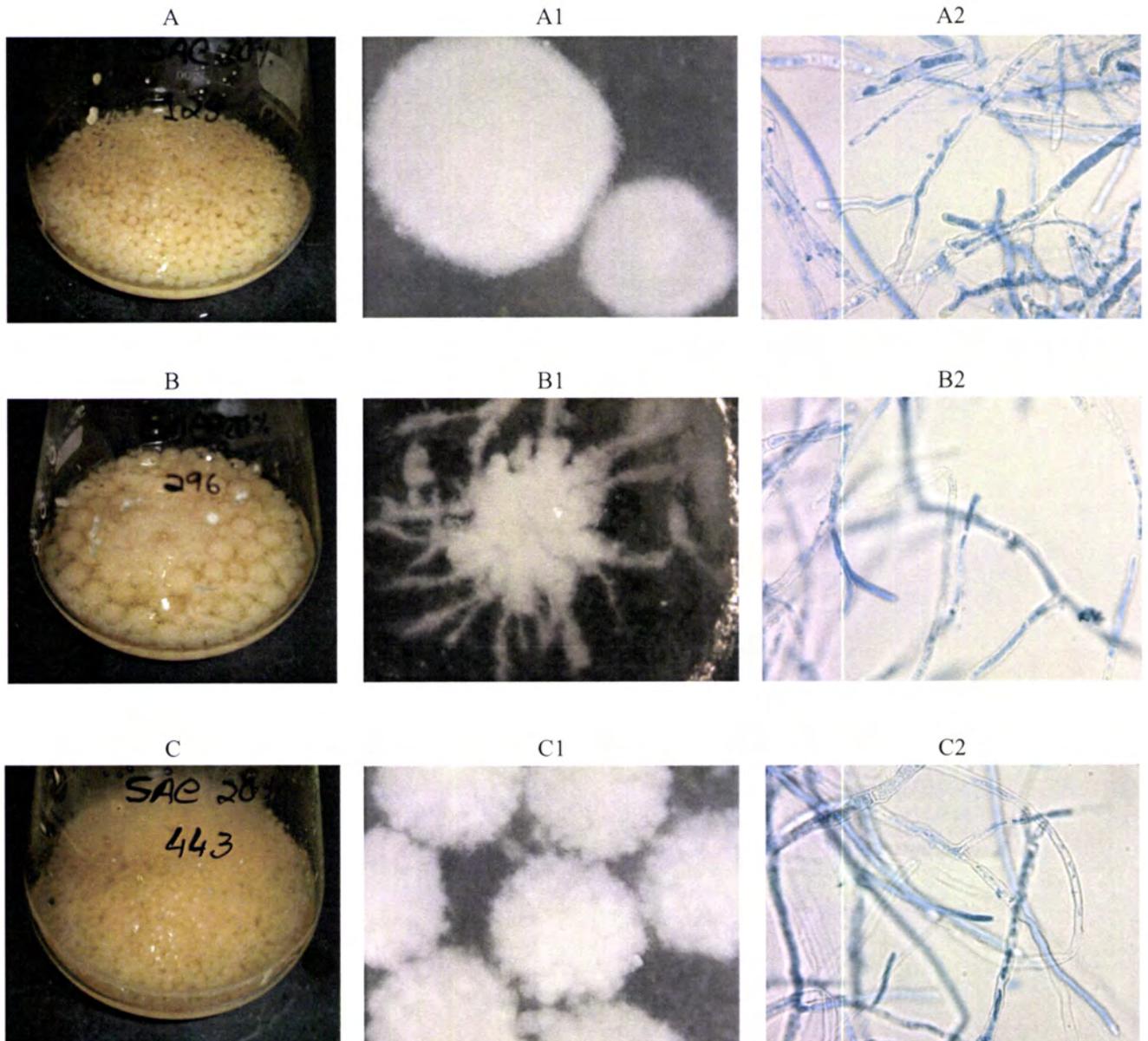


Figura 5.13 - Culturas de estirpes fúngicas. À esquerda: Culturas ao natural (A - *Aspergillus oryzae* 125; B - *Aspergillus niger* 296; C - *Aspergillus japonicus* 443); ao centro: Ampliação de 10x e 8x (A1 - ampliação 10x de *Aspergillus oryzae* 125; B1 - ampliação 10x de *Aspergillus niger* 296; C1 - ampliação 8x de *Aspergillus japonicus* 443); à direita: Ampliação de 40x (A2 - *Aspergillus oryzae* 125; B2 - *Aspergillus niger* 296; C2 - *Aspergillus japonicus* 443).

5.5.2. Separação de glúcidos por TLC

Os resultados obtidos resultantes da separação dos açúcares por TLC estão apresentados nos cromatogramas da Figura 5.14.

O cálculo do factor de retenção, R_f

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela banda}}{\text{Distância da frente do eluente}}$$

originou para: a glucose, $R_f = 0,42$; sacarose, $R_f = 0,27$; frutose, $R_f = 0,52$; FOS: $R_f = 0$

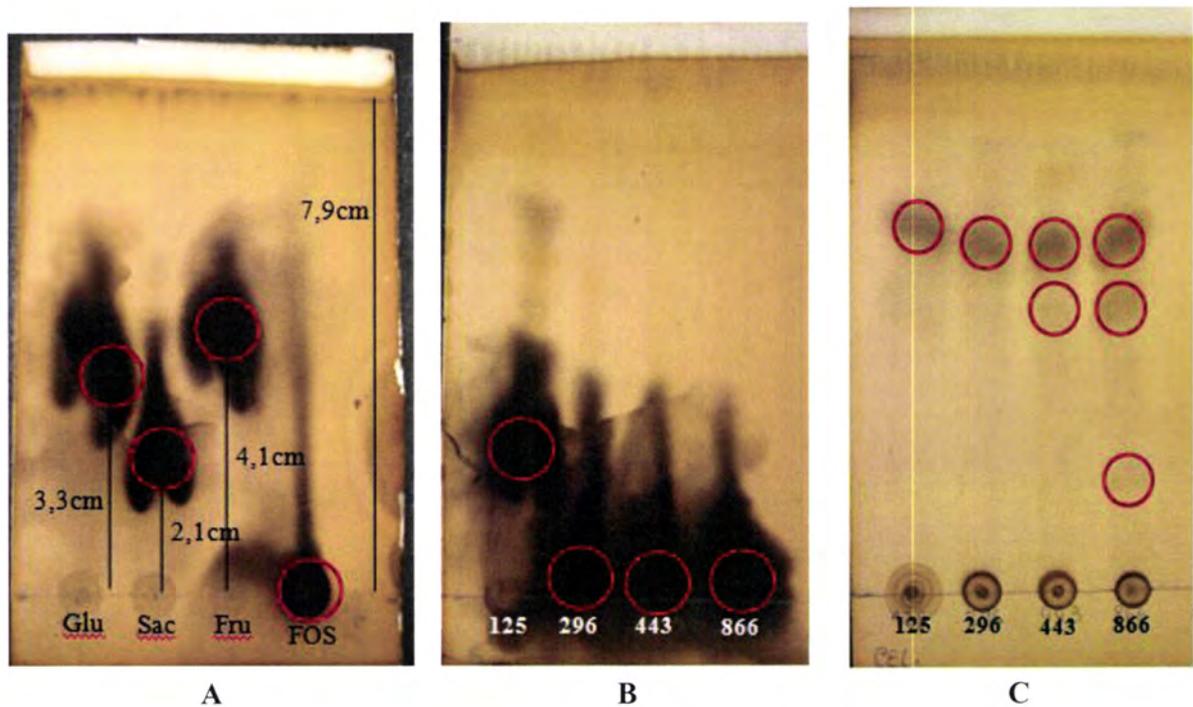


Figura 5.14 - Cromatogramas obtidos. A – Padrões (Glucose, Sacarose, Frutose e FOS); B – Amostras dos sobrenadantes das culturas das quatro estirpes fúngicas; C - Extractos intracelulares das quatro estirpes fúngicas.

Esta técnica de identificação permitiu detectar preliminarmente a presença dos FOS quer na amostra sobrenadante quer na amostra intracelular.

5.5.3. Quantificação da actividade enzimática FFase e da produção de FOS

A actividade da FFase intracelular e extracelular foi medida pela quantidade de glucose produzida a partir da sacarose. Uma unidade, U, de actividade de FTase é definida pela quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mole de glucose por minuto sob as condições do ensaio já especificadas.

A quantificação da glucose, resultante da acção do enzima FTase sobre a sacarose, pelo método do Kit Enzimático, nas amostras do 7º dia de fermentação do sobrenadante e das células das várias estirpes obtidas encontra-se na Tabela 5.6.

Tabela 5.4 - Quantificação da actividade enzimática pela medição da glucose, medida por Kit enzimático, produzida por acção do enzima FTase sobre a sacarose.

	Extr 0h	Extr 1h	Extr= 0-1h	U	Intr 0h	Intr 1h	Intr =0-1h	U
	mg/L	mg/L	mg/L	μ mole/min	mg/l	mg/l	mg/L	μ mole/min
<i>Aspergillus oryzae</i> 125	0,49	5,62	5,13	0,47	0,85	5,52	4,67	0,43
<i>Aspergillus niger</i> 296	1,05	5,63	4,58	0,42	1,17	3,78	2,61	0,24
<i>Aspergillus japonicus</i> 443	5,43	6,25	0,82	0,07	1,09	5,49	4,40	0,41
<i>Fusarium oxysporum</i> 866	6,16	5,69	0,00	0,00	1,56	3,09	1,53	0,14

(Extr. – extracelular; Intr. – intracelular)

A realização deste teste pretendeu de uma forma rápida detectar a presença de FOS resultante da acção da FFase sobre a sacarose. Assim, das estirpes *Aspergillus oryzae* CCMI 125, *Aspergillus niger* CCMI 296, *Aspergillus japonicus* CCMI 443 e *Fusarium oxysporum* CCMI 866, as estirpes *A. oryzae* CCMI 125 e a *A. niger* 296 são as estirpes que apresentam mais actividade enzimática no sobrenadante enquanto que as estirpes *A. oryzae* CCMI 125 e a *A. japonicus* CCMI 443 apresentam maior actividade no extracto intracelular. Com estes dados preliminares procedeu-se à análise cromatográfica por HPLC dos glúcidos presentes na amostra extracelular e na intracelular das estirpes utilizadas.

Optou-se por, atendendo à pesquisa bibliográfica e por limitações de tempo e de custos, somente fazer a quantificação dos FOS, da frutose, da glucose e da sacarose na amostra do 7º dia de fermentação. Apresenta-se, somente, os resultados para o *Aspergillus niger* CCMI 296 e *Aspergillus japonicus* CCMI 443 no Anexo E.

A partir dos cromatogramas obtidos e utilizando as regressões efectuadas, Anexo E, determinaram-se as quantidades de cada um dos glúcidos aos diferentes tempos de incubação, valores apresentados no Anexo E. Estes resultados permitiram construir os gráficos das Figura 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18 que permitem visualizar o consumo da sacarose, a libertação de glucose para o meio e a produção de 1-cestose e nistose. Durante os ensaios enzimáticos das várias estirpes utilizadas foi, também, interessante verificar a evolução da frutose.

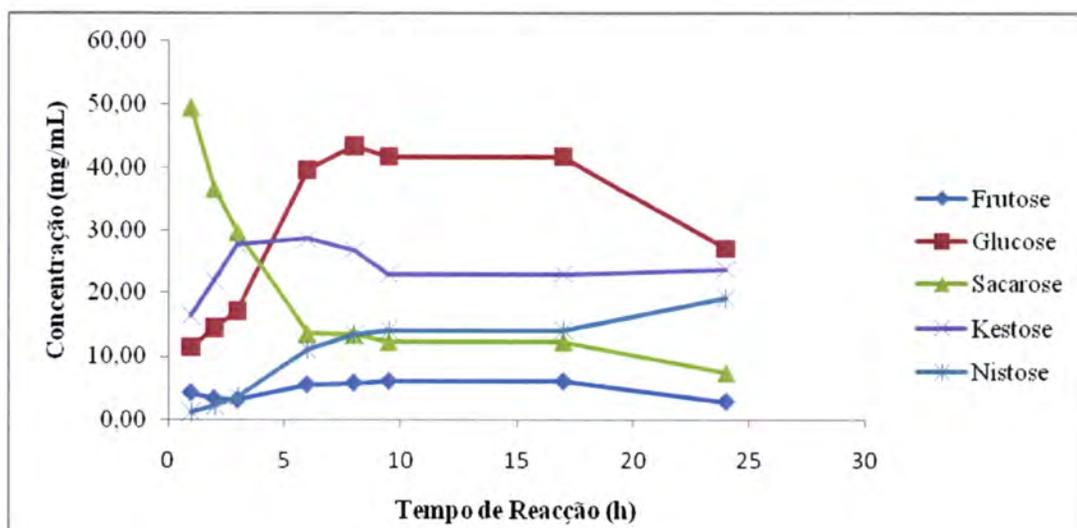


Figura 5.15 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de sobrenadante da estirpe de *Aspergillus japonicus* CCMI 443.

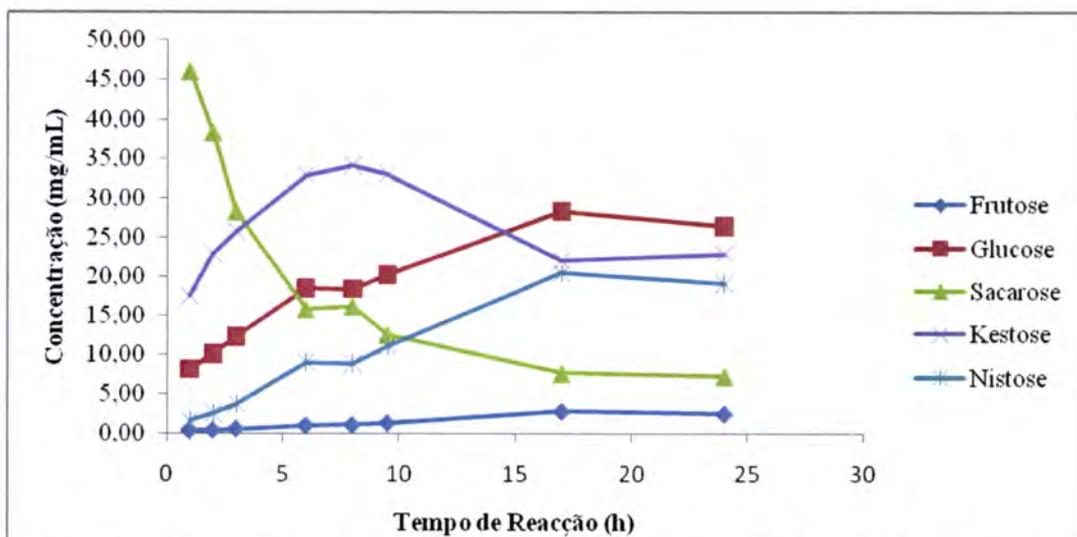


Figura 5.16 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de extracto intracelular da estirpe de *Aspergillus japonicus* (443).

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

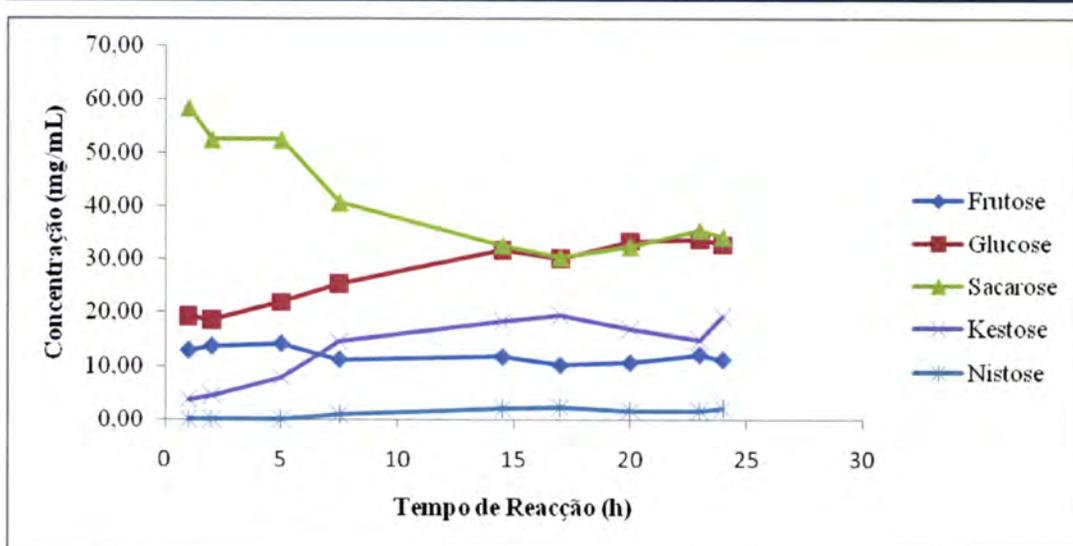


Figura 5.17 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de sobrenadante da estirpe de *Aspergillus niger* (296).

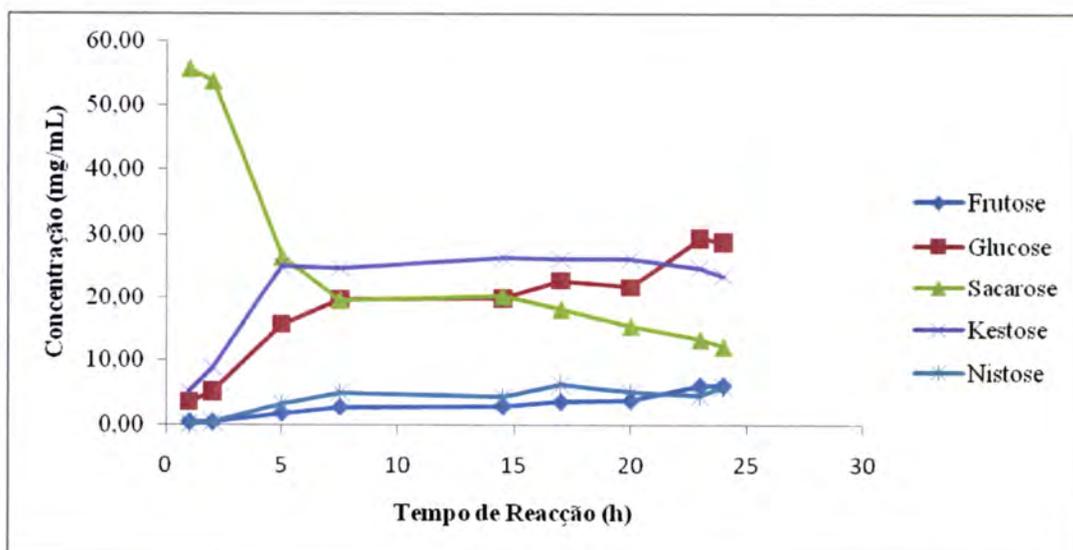


Figura 5.18 - Variação da concentração dos açúcares (Frutose, Glucose, Sacarose, 1-Cestose e Nistose) em função do tempo de reacção no ensaio enzimático da FFase, na amostra de extracto intracelular da estirpe de *Aspergillus niger* (296).

A partir da mesma Tabela em anexo (Anexo E) calcularam-se as quantidades de FOS produzidas no ensaio enzimático ao longo do tempo e relacionámo-las com a quantidade de sacarose inicial, Figuras 5.19 e 5.20 e com a quantidade de glúcidos totais, Figuras 5.21 e 5.22.

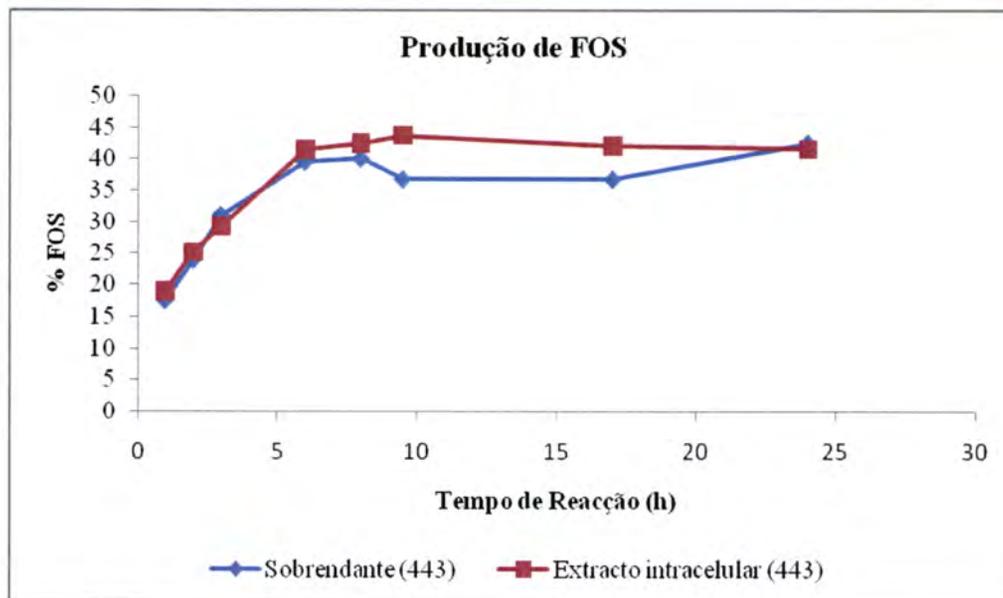


Figura 5.19 – Variação da percentagem de FOS ao longo do tempo de reacção do ensaio da FFase, para as amostras de sobrenadante e extracto intracelular da estirpe *Aspergillus japonicus* (443) numa cultura de 7 dias.

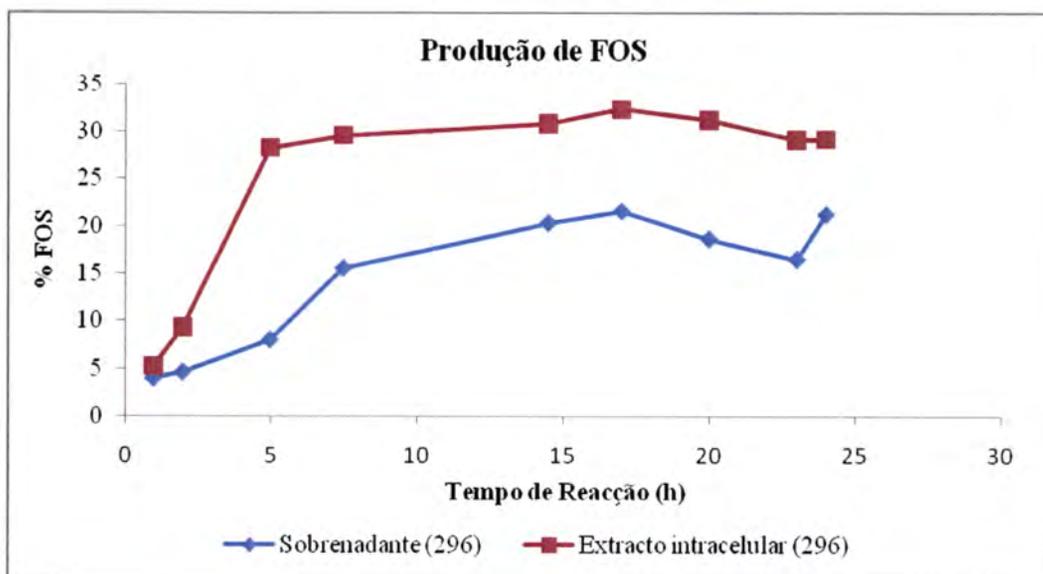


Figura 5.20 - Variação da percentagem de FOS ao longo do tempo de reacção do ensaio da FFase, para as amostras de sobrenadante e extracto intracelular da estirpe *Aspergillus niger* (296) numa cultura de 7 dias.

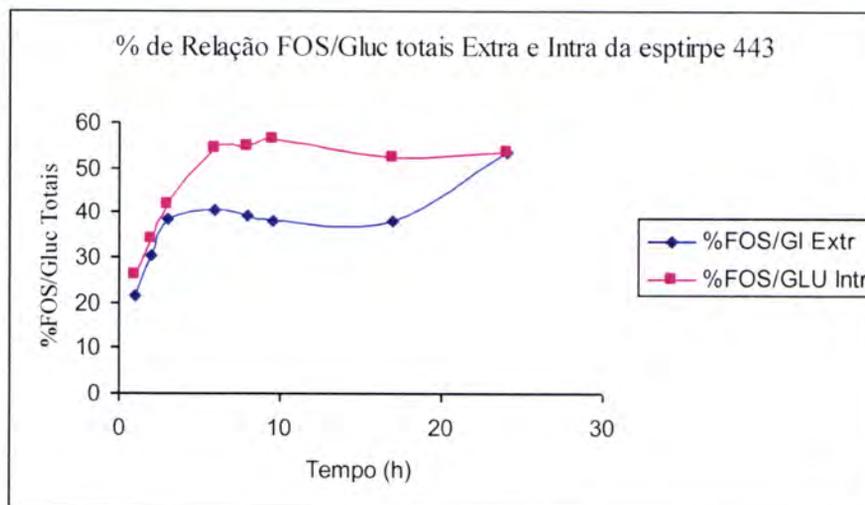


Figura 5.21 - Quantidade de FOS existentes em relação aos glúcidos totais para os ensaios enzimáticos da FFase do sobrenadante da cultura ao sétimo dia com *Aspergillus japonicus* CCMI 443.

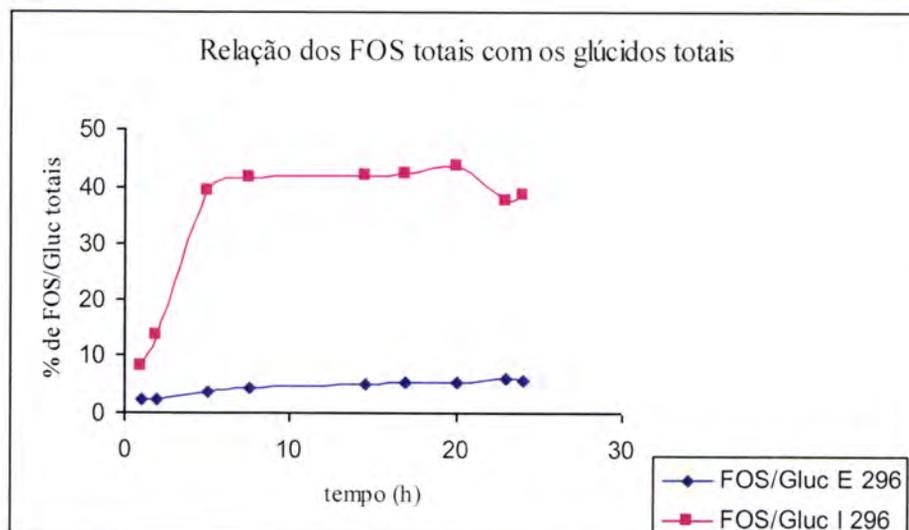


Figura 5.22 - Percentagem dos FOS totais da ação enzimática da amostra do sobrenadante e do extracto intracelular referente à estirpe *Aspergillus niger* CCMI 296 em relação aos glúcidos totais das respectivas amostras.

No caso do sobrenadante da cultura com o *Aspergillus japonicus* CCMI 443 é interessante verificar que houve um aumento exponencial de FOS nas primeiras horas do ensaio enzimático e que coincidiu com o aparecimento da cestose e que na parte final do ensaio deu-se um aumento da nistose com uma diminuição no meio de sacarose, frutose e glucose.

Para a estirpe *Aspergillus niger* CCMI 296 verifica-se uma actividade superior no extracto intracelular e uma actividade reduzida no sobrenadante.

Esta indicação é muito útil, pois permite pensar utilizar as células imobilizadas na produção de FOS.

A actividade enzimática da FFase, Figura 5.23 está de acordo com os resultados apresentados na Figura 5.22. Permite, ainda, afirmar que o tipo de extracto enzimático da cultura de sete dias, presente no ensaio enzimático, consome rapidamente a sacarose e posteriormente utiliza a frutose na produção de FOS. Permite, também, afirmar que o *Aspergillus japonicus* CCMI 443 produz enzimas com interesse na produção de FOS. Além disso quanto menor quantidade de sacarose, glucose e frutose existirem melhor é a qualidade do produto final em FOS. Os enzimas existentes, designado por FTase e por FFase são vários e a prevalência de uns em relação a outros pode influenciar a produção de um conteúdo de FOS até 98%, Yun (1996). O enzima β -frutofuranosidase, β -FFase, EC 3.2.1.26, com o enzima β -frutossiltransferase, β -FTase, EC 2.4.1.9, existente nas estirpes *Aspergillus niger* e *Aspergillus japonicus* são considerados adequados para produção industrial de FOS, (Dorta et al 2006).

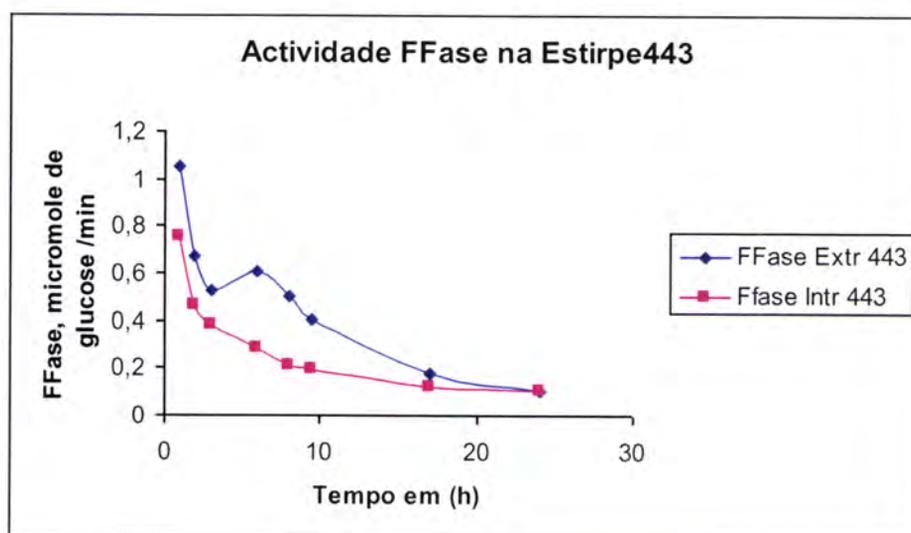


Figura 5.23 - Variação da actividade enzimática medida pela quantidade de glucose produzida com o sobrenadante da amostra da estirpe *Aspergillus japonicus* CCMI 443 recolhida no sétimo dia de cultura no ensaio enzimático com sacarose a 20%.

Na Figura 5.24 a actividade enzimática, medida em termos de micromoles de glucose por minuto não é um parâmetro suficiente como indicação de produção de FOS, pois, como se observa na Figura 5.22, os enzimas intracelulares são mais eficientes na produção de FOS. Yoshikawa et al. Considera-se muito importante os níveis das FFases (I, II, III, IV, V) existentes do meio na produção de FOS. A FFase I não é inibida pela presença da glucose, mas as actividades das FFases II-V são fortemente inibidas na presença de glucose. Estes investigadores verificaram, na estirpe *Aureobasidium pullulans* DSD2404, que a FFase I é muito importante na produção de FOS enquanto FFase IV pode funcionar como uma enzima degradante dos FOS, enzima com forte poder hidrolizante.

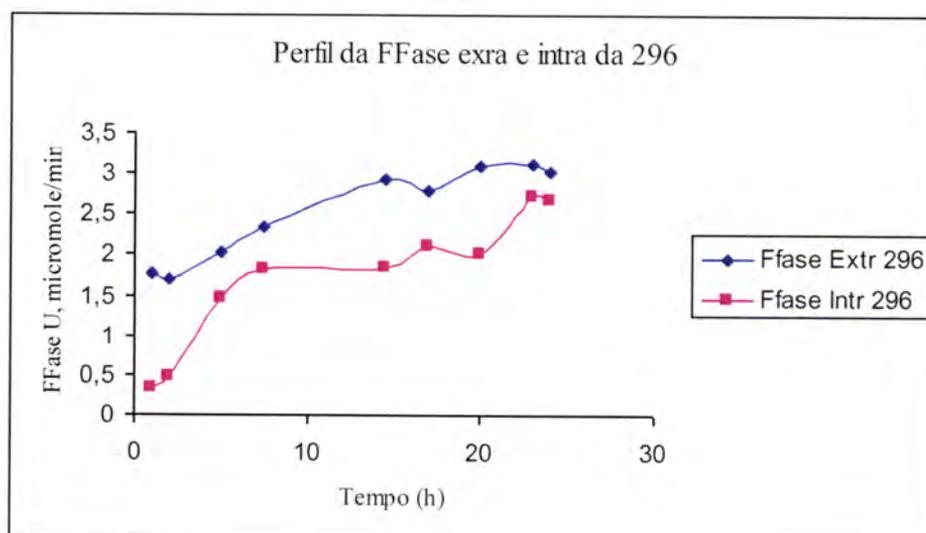


Figura 5.24 - Variação da actividade enzimática medida pela quantidade de glucose produzida com o sobrenadante da amostra da estirpe *Aspergillus niger* CCMI 296 recolhida no sétimo dia de cultura no ensaio enzimático com sacarose a 20%.

6.Considerações finais

Este trabalho desenvolveu-se na área da Microbiologia, Biotecnologia e Bioquímica e teve como objectivo principal a optimização e controlo de culturas de microrganismos. A implementação desta área científica no Ensino Secundário, especialmente nos cursos de formação para a vida activa, necessita deste desenvolvimento de conhecimento teórico e prático.

As culturas com duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* permitiram conhecer comportamentos cinéticos diferentes, quer perante os meios de cultura utilizados, quer relativamente às condições ambientais. Verificou-se que o tempo de cultura, 24h, foi adequado para a *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396, no entanto, com a *Saccharomyces cerevisiae* de origem vínica, designado por v. lab., o tempo utilizado, 24 horas, não foi suficiente para o seguimento de todos os meios de cultura. O tempo de consumo da fonte de carbono foi idêntico quando se utilizou o meio com glucose, mas totalmente diferente nos meios com as outras fontes de carbono. A velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* CCMI 396 e da *S. cerevisiae* v. lab., foi superior no meio com glucose a pH 5 e a 30°C.

O desenvolvimento das culturas e o seu acompanhamento permitiu dominar as técnicas mais adequadas quer na conservação de inóculos quer na utilização de condições assépticas durante os ensaios. A determinação dos parâmetros de controlo, a obtenção da evolução da concentração do substrato de carbono e dos diversos produtos e enzimas permitiram utilizar diversas técnicas analíticas e normalizar a sua utilização, como ferramentas de controlo destes processos.

Os valores obtidos permitiram tirar conclusões sobre a qualidade do trabalho que se executava. Assim, os valores obtidos para a *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 tiveram, em todos os meios de cultura utilizados, são valores obtidos com coeficientes de determinação elevados. A velocidade específica de crescimento no fermentador, com um meio a 20% de sacarose, com peptona e extracto de levedura a 1%, e suplementado com 80% de sumo de laranja, foi de $0,25h^{-1}$ com $R^2 = 0,99$. A determinação da

absorvância e do peso seco para acompanhamento da fermentação teve o valor de $R^2 = 0,985$.

O interesse actual da produção de fruto-oligossacáridos, FOS, originou o desenvolvimento da técnica analítica por HPLC para o acompanhamento dos diferentes compostos que existiam no meio de cultura extra e intra celular e a determinação da sua quantidade. A utilização *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396, *S. cerevisiae* v. lab., *Aspergillus oryzae* CCMI 125, *Aspergillus japonicus* CCMI 443, *Fusarium oxysporum* CCMI 866, *Aspergillus niger* CCMI 296 em meios de cultura com sacarose permitiu verificar quais os microrganismos a escolher para trabalhos de investigação futura.

Os dados obtidos permitem considerar que estas estirpes fúngicas têm potencial para a produção de FOS. As condições de meio de cultura e ambientais permitirão conhecer a estirpe de fungo mais adequado. A separação dos enzimas e a sua purificação determinarão qual o processo deve ser implementado e os estudos económicos ditarão a sua utilização ou não na produção industrial de FOS.

A investigação desenvolvida permitirá no futuro planear trabalhos com objectivos mais específicos e envolver os alunos do Ensino Secundário em actividades de cariz prático-experimental. Esta actividade prática prepará-los-á para o trabalho profissional nesta área biotecnológica de produção.

7.Referências bibliográficas

Alcarde, A. R., Basso, L. C. (1997) Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scientia Agrícola* 54: 189-194.

Alexandre, H., Plourde L. et al. (1998) Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144: 1103-1111.

Almeida M.J., Pais, C. (1996) Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4401-4404.

Almeida, M. J. C. (1997) Caracterização da flora zimológica de fermentos tradicionais e avaliação do seu potencial para utilização na indústria de panificação. Tese de Doutorado em Ciências, Escola de Ciências da Universidade do Minho, .

Aranda, J. S., Salgado, E., Taillandier, P. (2004) Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modelling. *Biochemical Engineering Journal* 17: 129-140.

Balasubramaniam A. K., Nagarajan, K. V., Paramasamy, G. (2001) Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry* 36: 1241-1247.

Barbosa, G. N. O. (2007) Production of fructosyltransferase by *Rhodotorula* sp. Master Science, University of Campinas, São Paulo, Brasil.

Cabib, E., Keller, F.A. (1971) Chitin and yeast budding allosteric inhibition of chitin synthetase by a heat-stable protein from yeast. *J. Biol. Chem.*, 246: 167-173.

Campos, L. (2002) Entender a Bioquímica, 3ª Edição, Escolar Editora, Lisboa.

Carvalho, J.C., Roseiro, F. M. & Gírio (1999) Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 16: 543-550.

Chen, W. C., Liu C. H. (1996) Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme Microbiology Technology 18: 153-160.

Chien, C. S., Lee, W. C., Lin, T. J. (2001) Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cells in gluten for production of fructooligosaccharides. Enzyme Microbiology Technology 29: 252-257.

Dhake, A. B., Patil, M. B. (2007) Effect of substrate feeding on production of fructosyltransferase by *Penicillium purpurogenum*. Brazilian Journal of Microbiology 38: 194 – 199.

Di Serio, M., De Alteriis, E., et al. (2001) A general kinetic and mass transfer model to simulate the baker's yeast growth in bioreactors. Catalysis Today 66: 437- 445.

Di Serio, M., Tesser, R., Santacesaria, E. (2001) A kinetic and mass transfer model to simulate the growth of baker's yeast in industrial bioreactors, Chemical Engineering Journal 82: 347-354.

Dickinson, R., Schweizer, M. (1999) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Taylor & Francis Ltd.

Doran, P. M. (1997). Bioprocess Engineering Principles, Academic Press.

Dorta, C., Cruz, R., Neto, P. O., Moura, D. J. C. (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. J Ind Microbiology Biotechnology 33:1003-1009.

Enfors, S.-O., Hedenberg, J. & Olsson, K. (1990) Simulation of dynamics in the baker's yeast process, *Bioprocess Engineering* 5: 191-198.

Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 469-486.

Ferreira, W.F.C., Sousa, J.CF. (1998) *Microbiologia*, Vol. I, LIDEL-Edições Técnicas Lda., Lisboa

Fonseca, M. Manuela, Teixeira, José A. (2007) *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*, LIDEL-Edições Técnicas Lda. , Lisboa.

Goffeau, A., Barrell, B. G. et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, 274 (5287): 546-567.

Hang, Y. D., Woodams, E. E., Jang, K. Y. (1995) *Biotechnology Letters*, 17: 295-298.

Hartwell, Leland H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriology Reviews*, 38: 164-198.

Hounsa, C., Brandt, E. V., et al. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144: 671-680.

Kristiansen, B. (1994) *Integrated design of a fermentation plan: the production of baker's yeast*. VCH Publishers, New York.

Jung, K. H., Yun, W. J., Kang, K. R., Lim, J. Y., Lee, J. H. (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microbiology Technology* 11: 491-494.

Lima, Nelson, Mota, Manuel (2003) *Biocnologia – Fundamentos e Aplicações*, LIDEL-Edições Técnicas Lda, Lisboa.

Lim, J. S., Lee, J. H., Kim, J. M., Park, S. W., Kim S. W. (2006) Effects morphology and rheology on neo-fructosyltransferase production by *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Bioprocess Engineering* 11: 100-104.

L'Hocine, L., Jiang, Z. W. B., Xu, S., (2000) Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J. Biotechnology* 81: 73-84.

Magonet, Etienne et al (1992) Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochemistry J.* 287: 361-365.

Maiorano, A. E., Piccoli, R. M., Silva, E. S., Rodrigues, M. F. A. (2008) Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnology Letters* 30: 1867-1877.

Mandlová, A. Barathova, A. M., Polakovic, M., Stefuca, V. Bales, V. (2000) Screening of microorganisms for transfructosylating activity and optimization of biotransformation of sucrose to fructooligosaccharides. *Chemical Pap* 53(6): 339-344.

McNeil, B., Harvey, L.M. (1990) *Fermentation: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford.

Moore, N. C. C., Yang, L. P., StormH., Oliva-Hemker, M., Saavedra, J. M. (2003) Effects of fructo-oligosaccharide- supplemented infant cereal : a double-blind, randomized trial. *BR J Nut* 90: 581-587.

Mussatto, S. I., Aguilar, C. N., Rodrigues, L., Teixeira, J.A. (2009) Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59: 76-81.

Nguyen, Q. D., Szabo, J. M. R., Bhat, M. K., Hoschke, A. P. (2005) Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem* 40: 2461-2466.

Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3^a Edition, Worth Publishers, USA.

Oda, Y., Ouchi, K. (1989) Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1495-1499.

Patel, V., Saunders G., Bucke C. (1994) Production of fructooligosaccharides by *Fuzarium oxysporum*. *Biotechnology Letters* 16(11): 1139-1144.

Pelczar, M. J., Chan, E. C. S. & Krieg, N. R.(1993) *Microbiology: Concepts and Applications*. McGraw-Hill, Inc. New York.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A.(1999). *Microbiology*. Fourth Edition. McGraw-Hill, Inc. New York.

Ratledge, C. (1991) Yeast physiology – a micro-synopsis, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 6: 195-203.

Rehm, J., Willminter, L., Heyer, A. G. (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol* 180: 1305-1144.

Sanchez, O. F., Rodriguez, A. M., Silva, E., Caicedo, L.A. (2008) Sucrose biotransformation to fructooligosaccharides by *Aspergillus* sp. N74 free cells. *Food Bioprocess Technology*

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. (2003) Production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Aspergillus orizae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochemistry* 30: 1-6

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. (2005a) Fructooligasaccharides production using frutosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspegillus oryzae* CFR 202. *Process Biochem* 40: 1085-1088.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. (2005b) Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligasaccharides. *Trends in Food Science & Tecnology* 16: 442-457.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. (2005c) Maximization of fructooligasaccharides production by two stage continuous process and its scale up. *Journal of Food Engineering* 68: 57-64.

Van Dijck, P., Colavizza, D. et al. (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 109-115.

Van Hoek, P., Van Dijken, J.P., Pronk, J. T. (1998) Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and Environmental Microbiology* :4226-4233.

Van Balken, J. Van Dooren, T., Van Den, T. W., Kamphuis, J., Meijer, E.M. (1991) Production 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1-fructosyltransferase. *Applied Microbiology Biotechnology* 35: 216-221

Vandáková, K, Antosová M. Polacovic, M. (2004) Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. *Chem Pap* 58(1): 15 – 22.

Voet, D., Voet, J. Pratt, C. (1999) *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, USA.

Wang, X. D., Rakshit, S. K. (1999). Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering* 20: 429-434.

Wang, X. D., Rakshit, S. K. (2000) Iso-oligosaccharides production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*. *Process Biochemistry* 35: 35: 771-775.

Wang, L. M., Zhou H. M. (2006) Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing β -fructofuranosidase and characterization of the enzyme. *J. Food Biochemistry* 30: 641 – 658.

Yang, Y. Zhou, H.M. (2001) Effect of Zinc Ions on Conformational Stability of Yeast Alcohol Dehydrogenase, *Biochemistry* 66: 47-54.

Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., Fujii, T. (2008) Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of *b*-fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnol Lett* 30: 535-539.

Yuan, J.Q., Bellgardt, K.H., Deckwer, W-D., Jiang, W-S. (1993) Modification and verification of the dynamic cell cycling model for baker's yeast. *Bioprocess Eng.* 9:173-182.

Yun J.W. (1996) Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microbial Technology* 19: 107-117.

Yun, J. W., Kim, B. W., Song, S. K. (1993) Enhanced production of fructosyltransferase and glucosyltransferase by substrate-feeding cultures of *Aureobasidium pullulans*. *J. Ferm Bioengineering* 84(3): 261 – 263.

Anexos

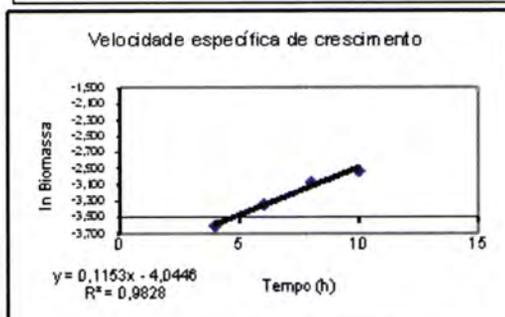
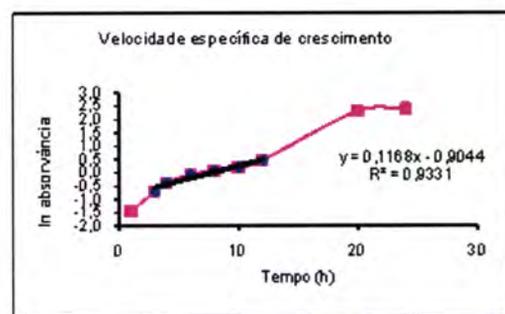
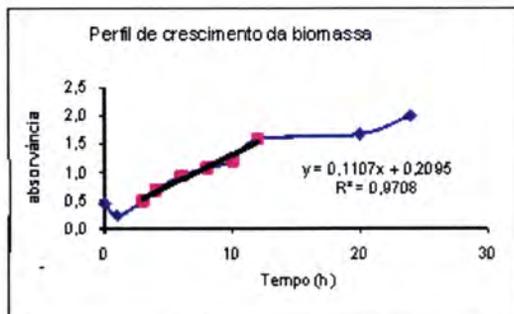
Anexo A

Resultados do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 e de *Saccharomyces cerevisiae* v. lab. no meio definido. Os resultados apresentados dizem respeito aos ensaios efectuados.

AI-Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em glucose a 30°C e pH 4

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	biom. rep1 (g/L)	biom. rep2 (g/L)	biom. g/L	ln biom. (g/L)	glucose rep1 (g/L)	glucose rep2 (g/L)	Glucose g/L	DpDO	DpBiom
0,47	0,405	0,451	0,442	0	-0,816	0,0181	0,0195	0,019	-3,974	20,201	20,32	20,26	0,033	0,001
0,276	0,234	0,2	0,237	1	-1,441	0,0146	0,0188	0,017	-4,092	19,753	19,858	19,81	0,038	0,003
0,533	0,459	0,477	0,490	3	-0,714	0,0215	0,0254	0,023	-3,753	17,777	18,834	18,31	0,039	0,003
0,727	0,699	0,632	0,686	4	-0,377	0,0294	0,025	0,027	-3,605	14,105	15,175	14,64	0,049	0,003
0,958	0,991	0,89	0,946	6	-0,055	0,0359	0,0344	0,035	-3,348	7,322	12,054	9,69	0,052	0,001
1,094	1,076	1,081	1,084	8	0,080	0,0431	0,0498	0,046	-3,069	2,912	6,602	4,76	0,009	0,005
1,231	1,119	1,298	1,216	10	0,196	0,0493	0,0576	0,053	-2,929	4,404	5,891	5,15	0,090	0,006
1,56	1,632	1,587	1,593	12	0,466	0,0612	0,0623	0,062	-2,785	3,783	3,74	3,76	0,036	0,001
1,781	1,519	1,738	1,679	20	2,303	0,0664	0,0659	0,066	-2,716	3,001	1,108	2,05	0,141	0,000
1,937	1,986	2,09	2,004	24	2,398	0,0698	0,0649	0,067	-2,698	2,493	1,069	1,78	0,078	0,003

DPGlucos (g/L)	Biom/HIX (g/L/h)	dt=μX (g/L/h)
0,084		
0,074		
0,747		
0,757		
3,346	0,008	0,003
2,609	0,011	0,004
1,051	0,007	0,005
0,030	0,008	0,006
1,339		
1,007		

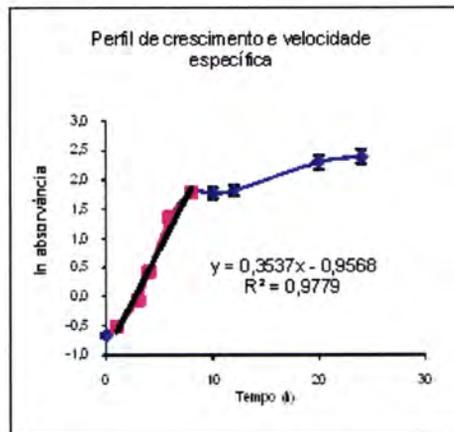


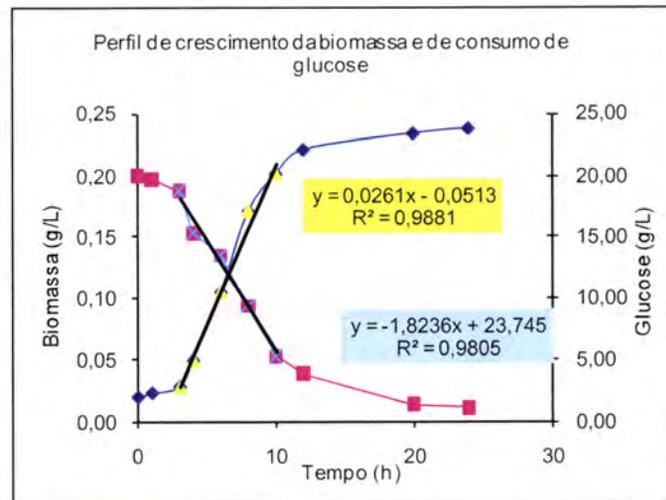
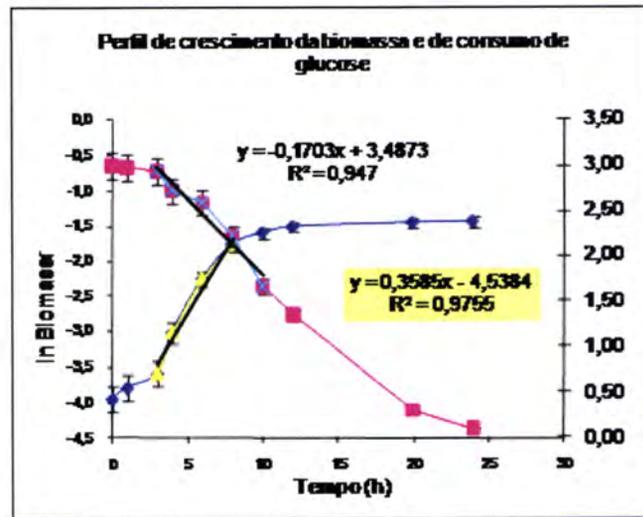
Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

A2 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em glucose a 30°C e pH 5

tempo (h)	D.O.1	D.O.2	D.O.3	ln	ln	ln	D.O.	ln D.O.	DP	biom. (g/L) rep.1	biom. (g/L) rep.2	gluc. (g/L)	gluc. (g/L)
0	0,52	0,51	0,51	-0,65	-0,68	-0,67	0,51	-0,67	0,010	0,02	0,02	19,78	20,11
1	0,60	0,59	0,60	-0,52	-0,52	-0,51	0,60	-0,52	0,004	0,02	0,02	19,39	19,76
3	0,91	0,96	0,93	-0,09	-0,04	-0,07	0,93	-0,07	0,021	0,03	0,02	19,01	18,82
4	1,53	1,55	1,53	0,43	0,44	0,42	1,54	0,43	0,005	0,05	0,05	14,94	15,30
6	3,86	3,95	3,23	1,35	1,37	1,17	3,91	1,36	0,089	0,10	0,11	13,51	13,48
8	6,01	6,02	6,02	1,79	1,79	1,80	6,02	1,79	0,001	0,19	0,16	9,76	9,33
10	5,90	5,90	5,87	1,77	1,78	1,77	5,89	1,77	0,003	0,22	0,18	8,56	5,26
12	6,20	6,14	6,20	1,82	1,81	1,82	6,18	1,82	0,005	0,23	0,22	4,74	3,85
20	7,17	7,19	7,17	1,97	1,97	1,97	7,18	2,30	0,001	0,25	0,22	1,96	1,35
24	7,35	7,35	7,34	1,99	1,99	1,99	7,34	2,40	0,001	0,25	0,23	1,41	1,11

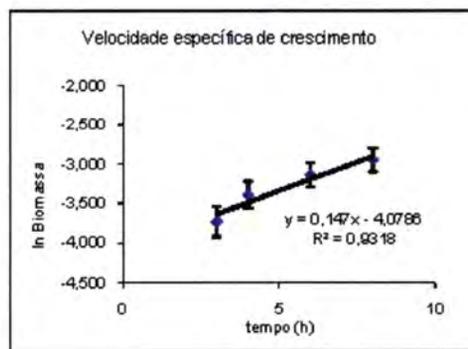
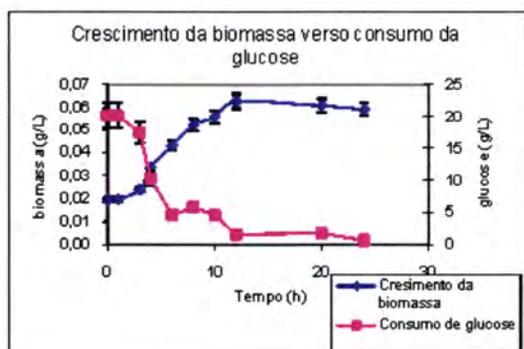
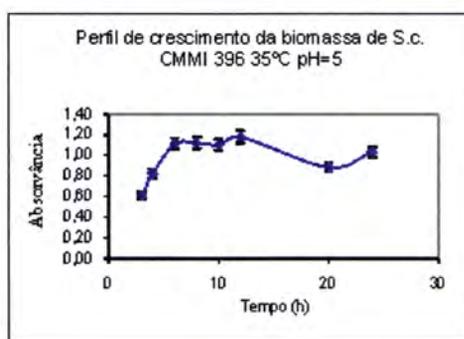
t h	biom. M (g/L)	biom./h	ln biom. g/L	ln Gluc g/L	biom. g/L	$r_x = dX/dt$ g ce/Lh	μ h ⁻¹	1/ μ h	S g gluc/L	1/S L/g gluc.	r_s g/Lh	r_s/X_v	r_x/X_v
0	0,02		-3,94	3,00	0,02				20,11	0,05			
1	0,02	0,003	-3,78	2,98	0,02	0,003	0,12	8,24	19,76	0,05	0,42767		0,1216
3	0,03	0,009	-3,58	2,94	0,03	0,009	0,31	3,18	18,82	0,05	1,48567		0,3147
4	0,05	0,026	-3,02	2,73	0,05	0,026	0,52	1,92	15,30	0,07	1,78067		0,5211
6	0,10	0,031	-2,26	2,60	0,10	0,031	0,29	3,41	13,48	0,07	1,494		0,293
8	0,17	0,024	-1,76	2,23	0,17	0,024	0,14	7,03	9,33	0,11	2,05475		0,1421
10	0,20	0,012	-1,60	1,66	0,20	0,013	0,06	16,14	5,26	0,19	1,36975		0,0619
12	0,22	0,003	-1,51	1,35	0,22	0,003	0,01	68,73	3,85	0,26	0,3909		0,0146
20	0,23	0,001	-1,45	0,30	0,23	0,001	0,01	169,16	1,35	0,74	0,22833		0,0059
24	0,24	0,012	-1,44	0,10	0,24	0,012	0,05	20,33	1,11	0,90			





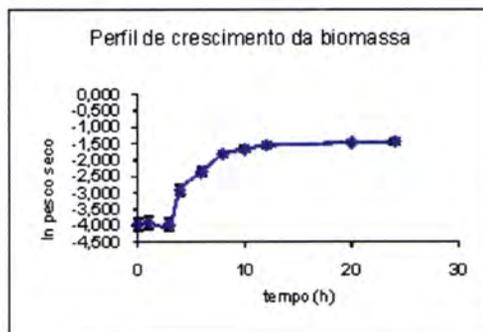
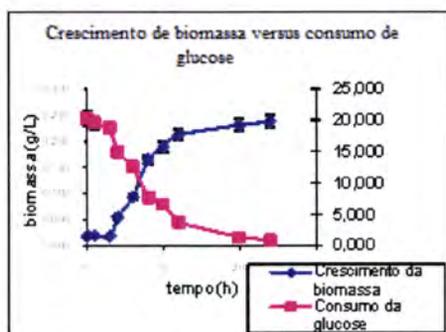
A3 - Resultados resultantes do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 396 em glucose a 35°C e pH 5

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempc	In ABS	tempo	biomassa	glucose	biomassa	glucose	Glucose	Media	In Biomasa
				(h)	(h)	(h)	(g/L) rep.1	rep1 (g/L)	(g/L) rep.2	rep2(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
0,498	0,456	0,51	0,488	0	-0,717	0	0,0189	20,205	0,0201	20,051	20,128	0,020	-3,937
0,421	0,367	0,328	0,372	1	-0,989	1	0,0195	20,202	0,0198	20,003	20,1025	0,020	-3,930
0,659	0,567	0,598	0,608	3	-0,498	3	0,0247	17,253	0,0231	17,72	17,4865	0,024	-3,734
0,855	0,823	0,798	0,825	4	-0,192	4	0,0358	9,24	0,0312	11,256	10,248	0,034	-3,396
1,11	1,128	1,109	1,116	6	0,109	6	0,0438	4,291	0,0423	5,009	4,65	0,043	-3,145
1,116	1,128	1,13	1,125	8	0,117	8	0,0506	6,579	0,0538	4,958	5,7685	0,052	-2,953
1,045	1,138	1,137	1,107	10	0,101	10	0,0523	4,605	0,0595	4,701	4,653	0,056	-2,884
1,192	1,175	1,18	1,182	12	0,167	12	0,0637	1,29	0,062	2,047	1,6685	0,063	-2,767
0,878	0,881	0,889	0,883	20	-0,125	20	0,0579	1,966	0,0638	1,693	1,8295	0,061	-2,799
1,002	1,1	0,996	1,033	24	0,032	24	0,0568	0,432	0,0618	1,009	0,7205	0,059	-2,825



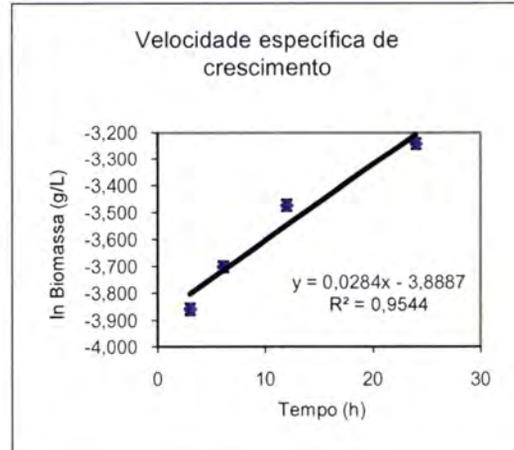
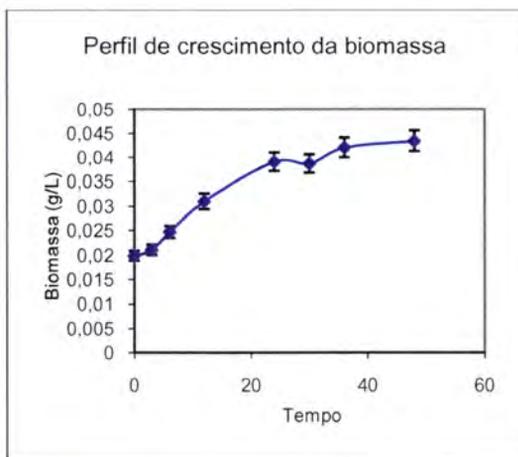
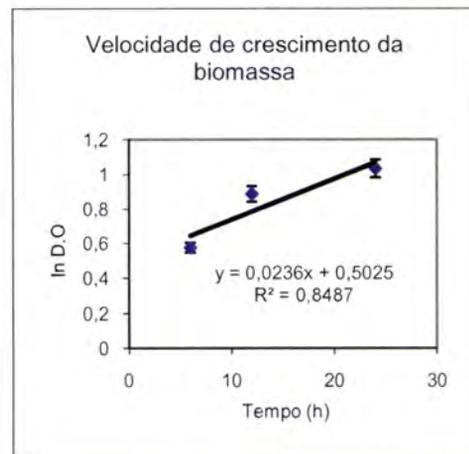
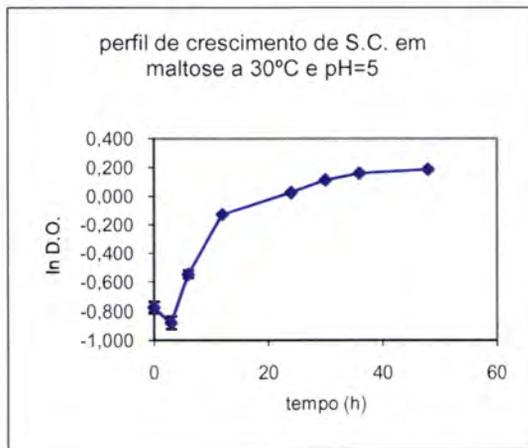
A4 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em glucose e NaCl a 30°C e pH 5

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	biomassa rep.1(g/L)	glucose (g/L)	biomassa (g/L) rep.2	glucose (g/L)	biomassa média (g/L)	ln biomassa (g/L)	Glucose (g/L)
0,429	0,473	0,495	0,466	0	-0,764	0,0185	19,916	0,0205	20,6	0,020	-3,937	20,258
0,351	0,391	0,426	0,389	1	-0,943	0,0189	19,408	0,0218	19,759	0,020	-3,895	19,584
0,762	0,798	0,777	0,779	3	-0,250	0,016	18,422	0,0225	19,252	0,019	-3,950	18,837
1,302	1,341	1,364	1,336	4	0,289	0,0571	14,591	0,0539	15,304	0,056	-2,891	14,948
2,56	2,911	2,826	2,766	6	1,017	0,1014	12,51	0,0876	12,82	0,095	-2,359	12,665
4,021	4,156	4,234	4,137	8	1,420	0,1762	8,57	0,1539	7,034	0,165	-1,802	7,802
3,855	3,76	3,42	3,678	10	1,302	0,1927	8,209	0,186	5,223	0,189	-1,664	6,716
6,086	6,112	6,099	6,099	12	1,808	0,2148	3,673	0,2097	3,849	0,212	-1,550	3,761
6,747	6,82	6,562	6,710	20	2,303	0,2354	1,203	0,2264	1,598	0,231	-1,466	1,401
6,95	6,743	6,911	6,868	24	2,398	0,2439	0,798	0,2301	1,028	0,237	-1,440	0,913



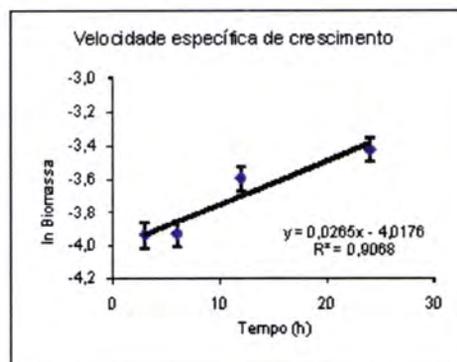
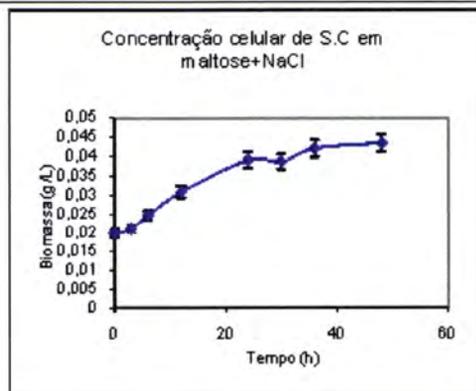
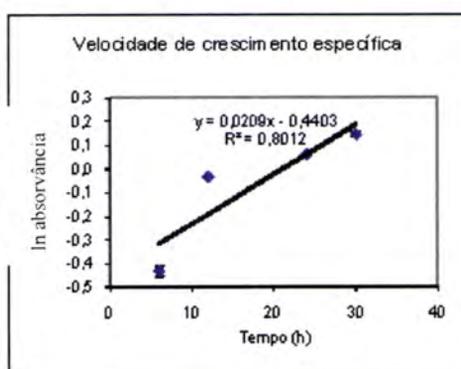
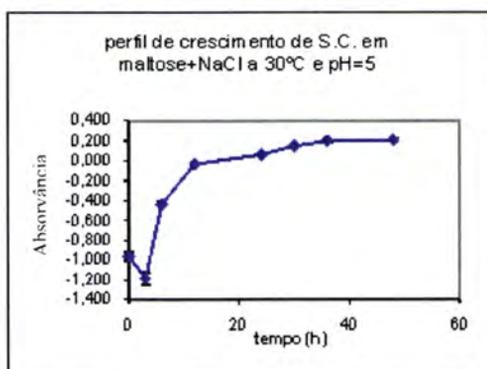
A5 -Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em maltose a 30°C e pH 5

tempo (h)	D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	tempo (t)	biomassa (g/L)	lnBiomassa (g/L)
0	0,466	0,456	0,464	0,462	0	-0,772	0	0,0199	-3,917
3	0,416	0,412	0,42	0,416	3	-0,877	3	0,0211	-3,858
6	0,578	0,584	0,575	0,579	6	-0,546	6,1	0,0247	-3,701
12	0,855	0,901	0,889	0,882	12	-0,126	12	0,031	-3,474
24	1,021	1,029	1,034	1,028	24	0,028	24	0,0391	-3,242
30	1,118	1,125	1,121	1,121	30	0,115	30	0,0387	-3,252
36	1,179	1,168	1,181	1,176	36	0,162	36	0,0421	-3,168
48	1,199	1,216	1,206	1,207	48	0,188	48	0,0435	-3,135



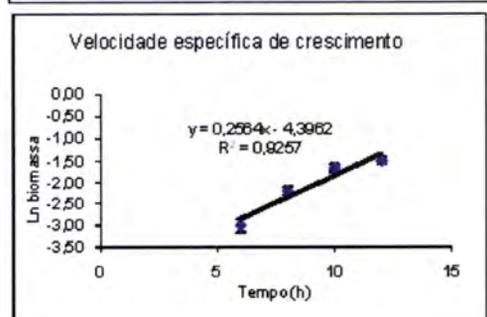
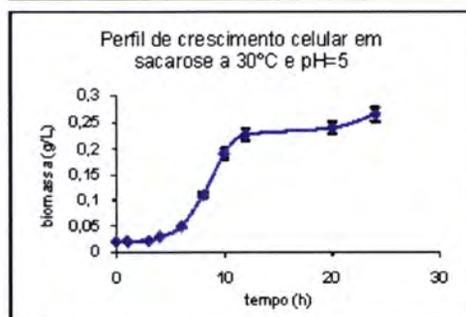
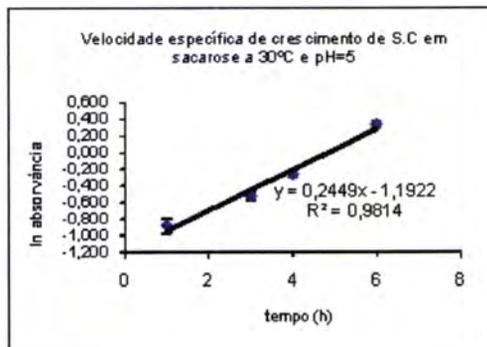
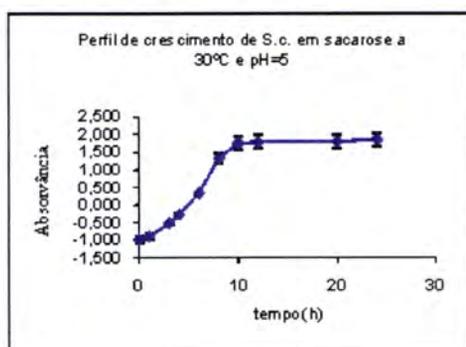
A6 – Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 396 em maltose e NaCl a 30 °C e pH 5

tempo (h)	D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	tempo (h)	biomassa (g/L)	ln biomassa (g/L)
0	0,375	0,393	0,379	0,382	0	-0,961	0	0,0180	-3,985
3	0,309	0,284	0,321	0,305	3	-1,189	3	0,0195	-3,937
8	0,049	0,053	0,047	0,050	8	-0,431	8	0,0190	-3,932
12	0,512	1,001	0,984	0,988	12	-0,035	12	0,0270	-3,590
24	1,082	1,037	1,078	1,060	24	0,004	24	0,0328	-3,417
30	1,148	1,155	1,171	1,158	30	0,147	30	0,038	-3,324
36	1,210	1,221	1,209	1,215	36	0,195	36	0,0391	-3,242
48	1,229	1,226	1,23	1,228	48	0,200	48	0,0397	-3,220



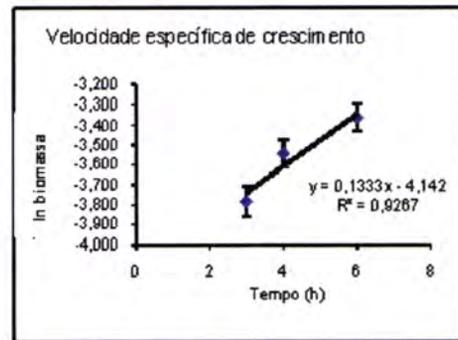
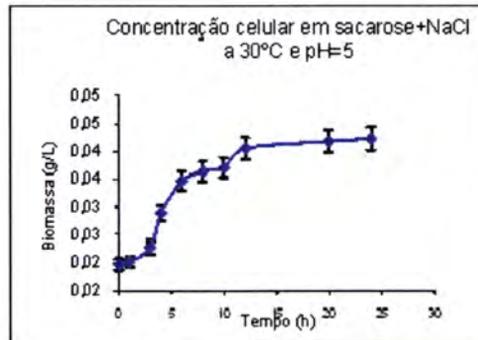
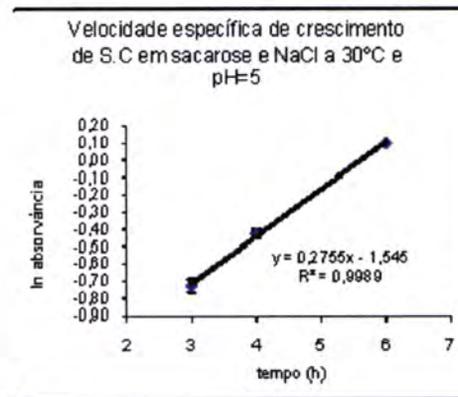
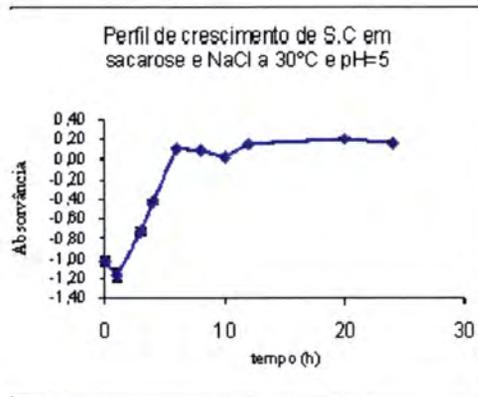
A7 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em sacarose a 30°C e pH 5.

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	tempo (h)	biomassa (g/L)	ln biomassa (g/L)
0,369	0,373	0,373	0,372	0	-0,990	0	0,0206	-3,882
0,39	0,389	0,469	0,413	1	-0,885	1	0,0213	-3,849
0,571	0,59	0,611	0,591	3	-0,527	3	0,0234	-3,755
0,767	0,76	0,755	0,767	4	-0,265	4	0,0237	-3,517
1,386	1,415	1,397	1,399	6	0,336	6	0,0461	-3,014
3,699	3,71	4,123	3,801	8	1,335	8	0,1108	-2,200
5,796	5,881	5,745	5,807	10	1,759	10	0,1915	-1,653
6,004	6,012	6,035	6,017	12	1,795	12	0,2281	-1,487
6,027	6,109	6,134	6,090	20	1,807	20	0,2392	-1,430
6,106	6,089	7,001	6,399	24	1,858	24	0,2645	-1,330



A8-Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 em sacarose a 35°C e pH 5

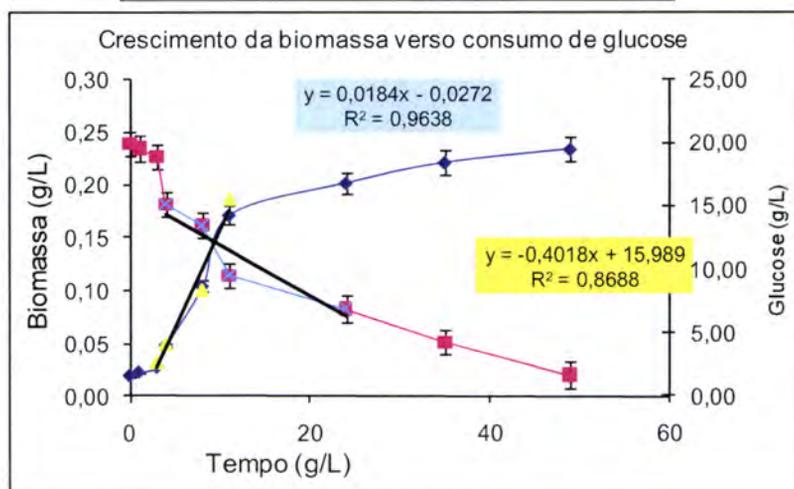
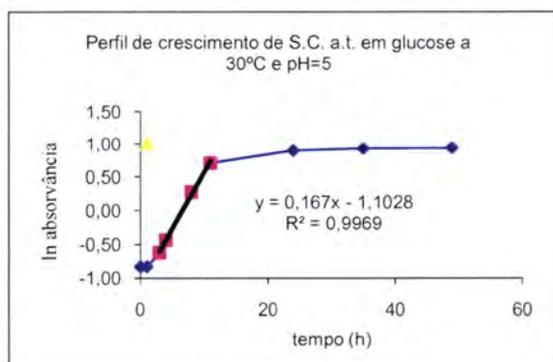
D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	tempo (h)	biomassa (g/L)	biomassa (g/L)
0,365	0,368	0,351	0,358	0	-1,027	0	0,020	-3,927
0,31	0,296	0,225	0,310	1	-1,170	1	0,020	-3,902
0,46	0,513	0,474	0,482	3	-0,729	3	0,023	-3,785
0,689	0,627	0,642	0,653	4	-0,427	4	0,029	-3,544
1,106	1,123	1,096	1,108	6	0,103	6	0,035	-3,364
1,107	1,092	1,078	1,092	8	0,088	8	0,036	-3,316
0,991	1,005	1,049	1,015	10	0,015	10	0,037	-3,294
1,165	1,184	1,16	1,170	12	0,167	12	0,041	-3,204
1,29	1,187	1,202	1,226	20	0,204	20	0,042	-3,172
1,193	1,22	1,114	1,178	24	0,162	24	0,042	-3,161

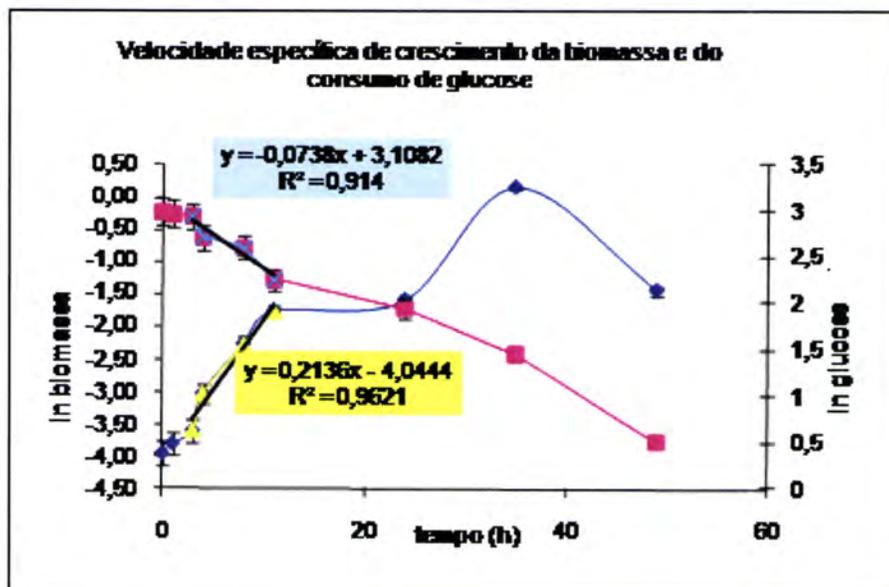


A9 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* v. lab. em glucose a 30°C e pH 5

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempo (h)	ln D.O.	tempo (h)	biomassa (g/L) rep.1	glucose (g/L)	biomassa (g/L) rep.2	glucose (g/L)	Biomassa Média (g/L)	lnBiomassa (g/L)	Glucose (g/L)
0,44	0,44	0,43	0,44	0	-0,83	0	0,02	19,78	0,02	20,11	0,02	-3,94	19,94
0,44	0,44	0,43	0,44	1	-0,83	1	0,02	19,39	0,02	19,76	0,02	-3,78	19,58
0,54	0,54	0,54	0,54	3	-0,62	3	0,03	19,01	0,02	18,82	0,03	-3,58	18,92
0,65	0,65	0,65	0,65	4	-0,43	4	0,05	14,94	0,05	15,30	0,05	-3,02	15,12
1,33	1,32	1,32	1,32	8	0,28	8	0,10	13,51	0,11	13,48	0,10	-2,26	13,49
2,02	2,02	2,02	2,02	11	0,70	11	0,19	9,76	0,16	9,33	0,17	-1,76	9,55
2,46	2,46	2,46	2,46	24	0,90	24	0,22	8,56	0,18	5,26	0,20	-1,60	6,91
2,54	2,54	2,54	2,54	35	0,93	35	0,23	4,74	0,22	3,85	0,22	0,16	4,30
2,58	2,57	2,54	2,56	49	0,94	49	0,25	1,96	0,22	1,35	0,23	-1,45	1,66

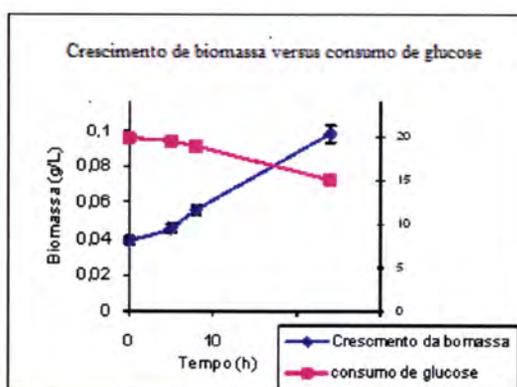
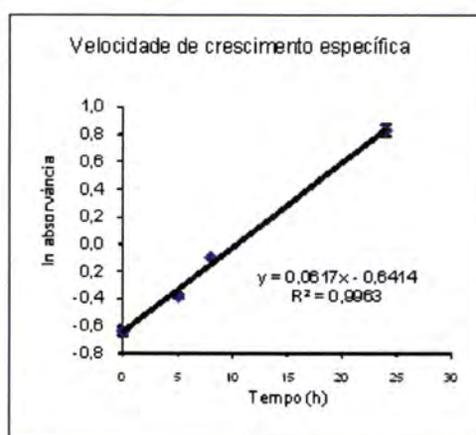
t h	biom. (g/L) g/L	r_x g/Lh	μ h-1	$1/\mu$ h	S g/L	1/S L/g	Glucose g/L
0	0,019				19,94	0,05	2,9928
1	0,023	0,003	0,13	7,6667	19,576	0,051	2,9743
3	0,028	0,0087	0,31	3,2308	18,92	0,053	2,9401
4	0,049	0,0152	0,31	3,2237	15,12	0,066	2,7161
8	0,104	0,0174	0,168	5,9672	13,49	0,074	2,6023
11	0,171	0,0061	0,036	27,918	9,55	0,105	2,256
24	0,202	0,0021	0,01	96,96	6,91	0,145	1,9328
35	0,221	0,0013	0,006	172,66	4,3	0,233	1,4576
49	0,234				1,66	0,602	0,5044





A10 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* v.lab. em glucose a 35°C e pH 5

D.O.1	D.O.2	D.O.3	D.O.	tempc	ln D.O.	tempo	biomassa	glucose	tempo	biomassa	glucose	biomassa	lnBiomassa	Glucose
				(h)		(h)	(g/L) rep.1	(g/L)	(h)	(g/L) rep.2	(g/L)	M (g/L)	(g/L)	M (g/L)
0,534	0,521	0,528	0,528	0	-0,639	0	0,0202	19,778	0	0,0187	20,105	0,0389	-3,247	19,9415
0,699	0,676	0,681	0,685	5	-0,378	1	0,0237	19,391	1	0,0218	19,761	0,0455	-3,090	19,576
0,917	0,895	0,91	0,907	8	-0,097	3	0,0321	19,012	3	0,0234	18,822	0,0555	-2,891	18,917
2,305	2,295	2,299	2,300	24	0,833	4	0,0498	14,938	4	0,0482	15,304	0,098	-2,323	15,121



A11 – Valores de velocidade específica de crescimento para as estirpes *Saccharomyces cerevisiae*

Tabela A.1. – Valores de velocidade específica de crescimento para a estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* variando a fonte de carbono, a temperatura e o pH do meio.

Saccharomyces cerevisiae CCM1 396

	Vel. esp. cres., μ (h^{-1})		Vel. Esp. Cresc., μ (h^{-1})		Correlação	
	Absorvância		No peso seco			
Gluc. 30°C pH = 4	$y = 0,117x - 0,90$	$R^2 = 0,93$	$y = 0,115x - 4,04$	$R^2 = 0,98$	$y = 29,06x - 0,17$	$R^2 = 0,96$
Gluc. 30°C pH=5	$y = 0,354x - 0,96$	$R^2 = 0,98$	$y = 0,359x - 4,54$	$R^2 = 0,98$	$y = 30,05x + 0,13$	$R^2 = 0,97$
Gluc. 35°C pH=5	$y = 0,195x - 1,04$	$R^2 = 0,96$	$y = 0,147x - 4,08$	$R^2 = 0,93$	$y = 14,57x + 0,25$	$R^2 = 0,77$
Gluc. NaCl 30°C pH=5	$y = 0,283x - 0,79$	$R^2 = 0,97$	$y = 0,273x - 3,99$	$R^2 = 0,99$	$y = 27,40x - 0,08$	$R^2 = 0,95$
Maltose 30°C pH=5	$y = 0,024x + 0,50$	$R^2 = 0,85$	$y = 0,028x - 3,89$	$R^2 = 0,95$	$y = 33,72x - 0,24$	$R^2 = 0,98$
Malt. NaCl 30°C pH=5	$y = 0,021x - 0,44$	$R^2 = 0,80$	$y = 0,027x - 4,02$	$R^2 = 0,91$	$y = 39,50x - 0,28$	$R^2 = 0,90$
Sacarose 30°C pH=5	$y = 0,245x - 1,12$	$R^2 = 0,98$	$y = 0,256x - 4,40$	$R^2 = 0,93$	$y = 26,08x + 0,10$	$R^2 = 0,97$
Sacarose 35°C pH=5	$y = 0,275x - 1,54$	$R^2 = 0,88$	$y = 0,133x - 4,14$	$R^2 = 0,94$	$y = 40,26x - 0,45$	$R^2 = 0,96$
Sac. NaCl a 30°C pH=5	$y = 0,276x - 1,55$	$R^2 = 0,99$	$y = 0,133x - 4,14$	$R^2 = 0,93$	$y = 40,26x - 0,45$	$R^2 = 0,96$

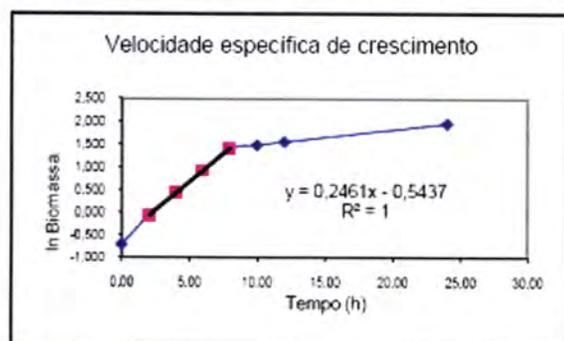
Saccharomyces cerevisiae v. lab.

	Vel. esp. cres., μ (h^{-1})		Vel. Esp. Cresc., μ (h^{-1})		Correlação	
	Absorvância		No peso seco			
Gluc. 30°C pH=5	$y = 0,167x - 1,10$	$R^2 = 0,99$	$y = 0,359x - 4,54$	$R^2 = 0,98$	$y = 10,52x + 0,21$	$R^2 = 0,99$
Gluc. 35°C pH=5	$y = 0,062x - 0,64$	$R^2 = 0,99$	$y = 0,233x - 3,39$	$R^2 = 0,80$	$y = 30,47x - 0,71$	$R^2 = 0,99$
Gluc. NaCl 30°C pH=5	$y = 0,020x - 0,68$	$R^2 = 0,98$	$y = 0,205x - 3,99$	$R^2 = 0,86$	$y = 10,092x + 0,33$	$R^2 = 0,99$
Maltose 35°C pH=5	$y = 0,069x - 0,85$	$R^2 = 0,99$	$y = 0,233x - 4,06$	$R^2 = 0,80$	$y = 59,66x - 0,72$	$R^2 = 0,95$
Malt. NaCl 30°C pH=5	$y = 0,054x - 0,73$	$R^2 = 0,96$	$y = 0,039x - 3,94$	$R^2 = 0,99$	$y = 41,54x - 0,32$	$R^2 = 0,99$
Sacarose 30°C pH=5	$y = 0,069x - 0,85$	$R^2 = 0,99$	$y = 0,233x - 4,06$	$R^2 = 0,80$	$y = 26,08x + 0,09$	$R^2 = 0,97$
Sacarose 35°C pH=5	$y = 0,054x - 0,73$	$R^2 = 0,96$	$y = 0,039x - 3,939$	$R^2 = 0,99$	$y = 41,544x - 0,32$	$R^2 = 0,99$
Sac. NaCl a 30°C pH=5	$y = 0,039x - 0,01$	$R^2 = 0,86$	$y = 0,0593x - 3,14$	$R^2 = 0,88$	$y = 10,536x + 0,44$	$R^2 = 0,97$

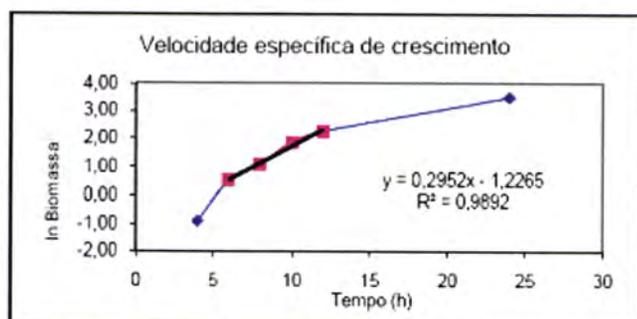
Anexo B

B1 - Produção de biomassa da estirpe *S. cerevisiae* v. lab.

Cultura de <i>S. cerevisiae</i> no meio de cultura sem residuo								S c. v. lab.		
Tempo (h)	Peso 0 (g/L)	Peso 1 (g/L)	P1-P0 (g/L)	Biomassa (g/L)	Peso 0 (g/L)	Peso 1 (g/L)	P1-P0 (g/L)	Biomassa (g/L)	Biom Média (g/L)	In Biomassa (g/L)
0.00	0.92	0.92	0.00	0.70	0.90	0.90	0.00	0.30	0.5	-0,693
2.00	0.90	0.90	0.00	1.10	0.92	0.92	0.00	0.80	0,95	-0,051
4.00	0.93	0.93	0.00	1.70	0.97	0.98	0.00	1.40	1,55	0,438
6.00	0.93	0.94	0.00	2.80	0.93	0.93	0.00	2.30	2,55	0,936
8.00	0.94	0.94	0.00	4.20	0.91	0.91	0.00	4.10	4,15	1,423
10.00	0.93	0.94	0.00	4.60	0.93	0.93	0.00	4.30	4,45	1,493
12.00	0.93	0.93	0.00	4.90	0.93	0.94	0.00	4.70	4,8	1,569
24.00	0.93	0.93	0,01	7.80	0.93	0.94	0,01	6.60	7,2	1,974



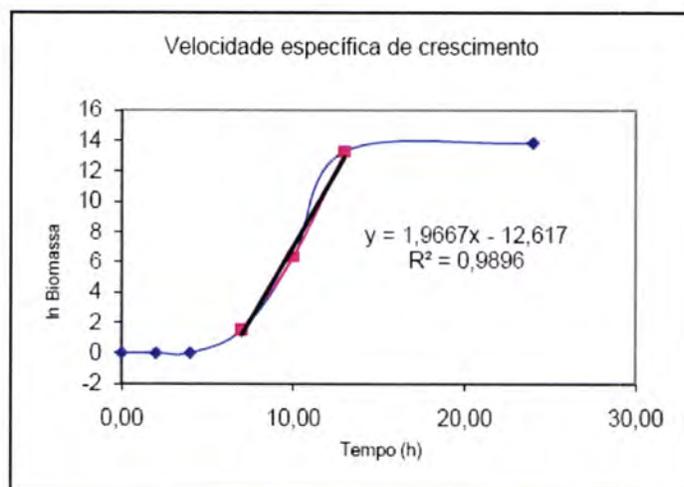
Cultura de <i>S. cerevisiae</i> v. lab. suplementada com laranja										
Tempo (h)	Peso 0 (g/L)	Peso 1 (g/L)	P1-P0 (g/L)	Biomassa (g/L)	Peso 0 (g/L)	Peso 1 (g/L)	P1-P0 (g/L)	Biomassa (g/L)	Biom Média (g/L)	In Biomassa (g/L)
0	0.8183	0.8207	0.0024	-	0.90	0.90	0.00	-	0.00	
2	0.8665	0.8688	-0.0001	0	0.93	0.93	0.00	0.00	0.00	
4	0.9036	0.9063	0.0003	0,3	0.98	0.98	0.00	0,10	0,40	-0,92
6	0.9218	0.9253	0.0011	1,1	0.93	0.93	0.00	0,60	1,70	0,53
8	0.9042	0.9085	0.0019	1,9	0.94	0.94	0.00	1,10	3,00	1,10
10	0.8975	0.9032	0.0033	3,3	0.94	0.95	0.00	3,00	6,30	1,84
12	0.9298	0.9372	0.005	5	0.93	0.94	0.00	4,50	9,50	2,25
24	0.9313	0.9503	0.0166	16.6	0.94	0.96	0.02	16.70	33.30	3,51



Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* no meio de cultura suplementado com tomate

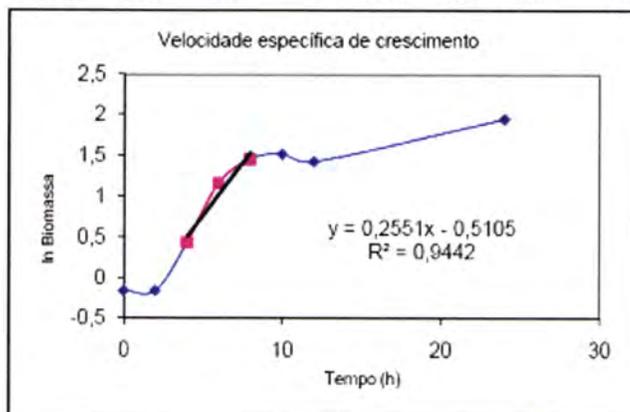
Tempo (h)	Biomassa (g/L)	Biomassa (g/L)	Biom Média (g/L)	In Biomassa (g/L)
0,00	-	-	-	-
2,00	0	0,0000		
4,00	0	0,0000		
7,00	1,5	0,4000	0,95	-0,05129329
10,00	6,35	5,4000	5,875	1,77070606
13,00	13,3	11,5500	12,425	2,51971057
24,00	13,85	15,2000	14,525	2,6758713



B2 – Produção de biomassa da estirpe *S. cerevisiae* CCMI 396

Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* no meio de cultura sem suplemento de residuo

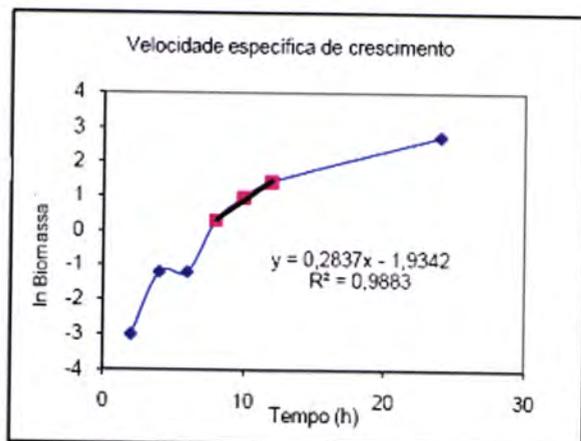
Tempo	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Biom Média	In Biomassa
0	0,9351	0,9363	0,0012	1,2	0,8925	0,893	0,0005	0,5	0,85	-0,16251893
2	0,9169	0,9176	0,0007	0,7	0,9296	0,9306	0,001	1	0,85	-0,16251893
4	0,94	0,9416	0,0016	1,6	0,9103	0,9118	0,0015	1,5	1,55	0,43825493
6	0,9301	0,9333	0,0032	3,2	0,8931	0,8963	0,0032	3,2	3,2	1,16315081
8	0,9287	0,9328	0,0041	4,1	0,9774	0,9819	0,0045	4,5	4,3	1,45861502
10	0,94	0,9445	0,0045	4,5	0,9305	0,9351	0,0046	4,6	4,55	1,51512723
12	0,8909	0,8956	0,0047	4,7	0,9403	0,9439	0,0036	3,6	4,15	1,42310833
24	0,9292	0,9362	0,007	7	0,9331	0,94	0,0069	6,9	6,95	1,93874166



Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

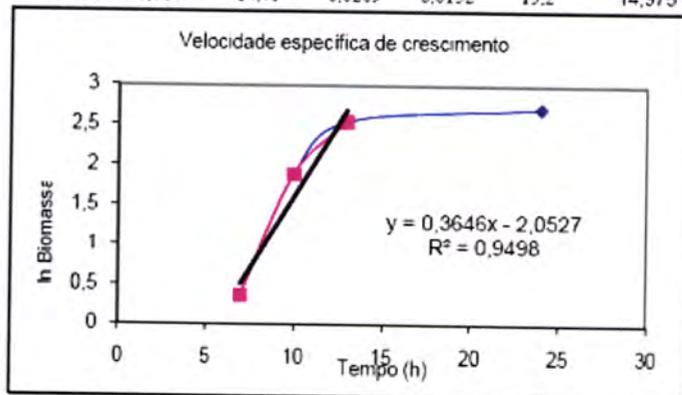
Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 no meio de cultura com sumo de laranja

Tempo	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Biom Média	In Biomassa
0	0,9283	0,9303	0,002	-	0,9066	0,9091	0,0025	-		
2	0,8964	0,8984	0	0	0,8897	0,8923	0,0001	0,1	0,05	-2,99573227
4	0,9134	0,9157	0,0003	0,3	0,9314	0,9342	0,0003	0,3	0,3	-1,2039728
6	0,9377	0,9403	0,0006	0,6	0,929	0,9312	-0,0003	0	0,3	-1,2039728
8	0,9344	0,9378	0,0014	1,4	0,9102	0,914	0,0013	1,3	1,35	0,30010459
10	0,9299	0,9348	0,0029	2,9	0,9056	0,9105	0,0024	2,4	2,65	0,97455964
12	0,9167	0,9231	0,0044	4,4	0,9303	0,9368	0,004	4	4,2	1,43508453
24	0,9723	0,9896	0,0153	15,3	0,8917	0,9103	0,0161	16,1	15,7	2,75366071

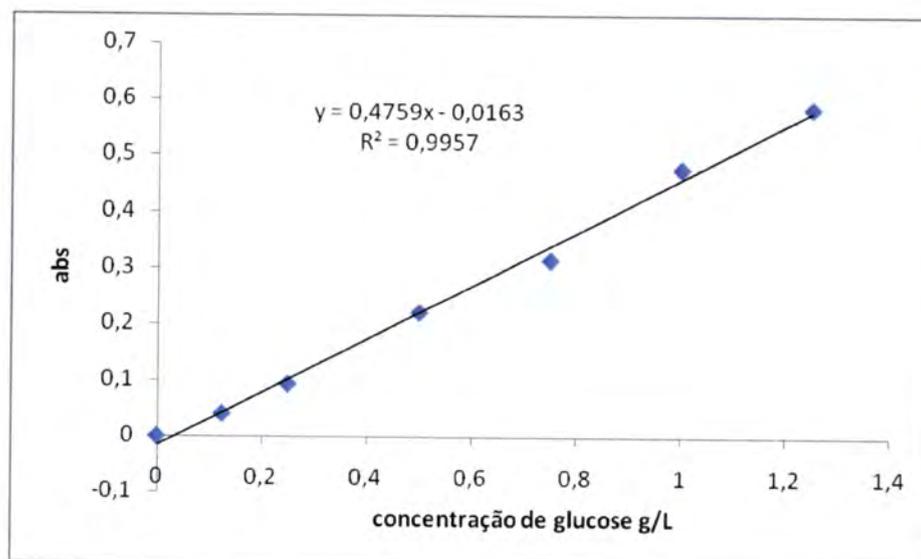


Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 no meio de cultura com tomate

Tempo	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Peso 0	Peso 1	P1-P0	Biomassa	Biom. M (g/L)	In biom
0	0,0054	-	-	0,0057	-	-	-	-		
2	0,0056	0,0002	0,2	0,0056	-0,0001	-	0			
4	0,0059	0,0005	0,5	0,005	-0,0007	-	0			
7	0,0075	0,0021	2,1	0,0064	0,0007	0,75	1,425	0,3541718		
10	0,0126	0,0071	7,15	0,0117	0,006	6	6,575	1,8832746		
13	0,0186	0,0131	13,15	0,018	0,0123	12,25	12,7	2,541602		
24	0,0202	0,0147	14,75	0,0209	0,0152	15,2	14,975	2,7063821		



B3 - Curva de calibração da glucose pelo método DNS.

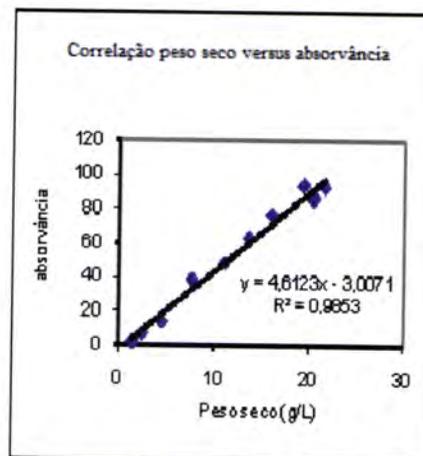
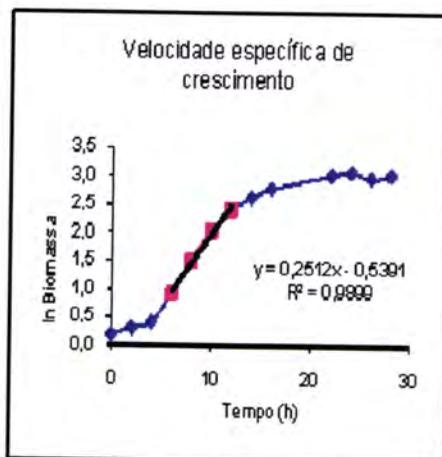


Anexo C

0	0,283		28,3	34,2	2,65	0,00	4,55	1,52
10	0,528		52,8	38,7	3,68	0,00	7,7	2,04
12	0,628		62,8	48,7	3,88	0,00	11,2	2,42
14	0,771		77,1	83	4,34	0,00	13,65	2,61
16	0,805	1,200	80,5	76,4	4,34	0,02	14,1	2,78
22	0,508		50,8	87,1	4,47	0,02	20,5	3,02
24	0,537		53,7	83,3	4,54	0,02	21,7	3,08
26	0,541		54,1	84,1	4,54	0,02	19,4	2,87
28	0,487	1,200	48,7	85,3	4,45	0,02	21,45	3,02

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	dx/dt			S (equivalente) g/l	1/S
		r_s	μ h ⁻¹	1/ μ h		
0	1,2				20,11	
2	1,35	0,08	0,06		16,29	
4	1,5	0,29	0,19		17,08	
6	2,5	0,78	0,31	3,28	14,3	0,07
8	4,55	1,30	0,29	3,50	11,4	0,08
10	7,7	1,66	0,22	4,63	7,29	0,14
12	11,2	1,49	0,13	7,53	4,56	0,22
14	13,65	1,23	0,08	11,14	2,6	0,38
16	14,1	0,86	0,05	19,80	1,2	0,83
22	20,5	0,70	0,03	29,29	0,55	1,82
24	21,7	-0,28	-0,01		0,14	
26	19,4	-0,31	-0,02		0,14	
28	21,45	0,75				

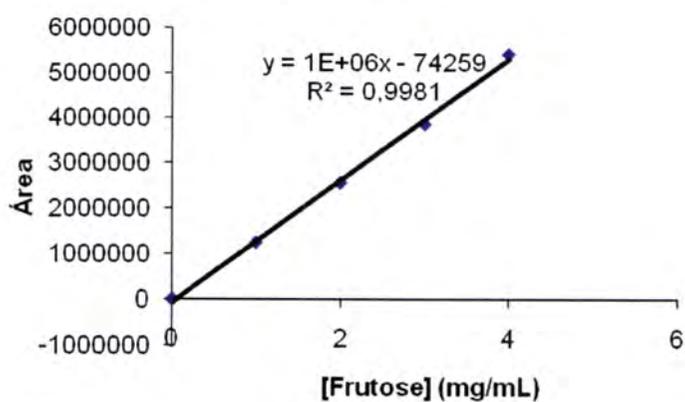
dx/dT 5,68 1,41875 g/Lh



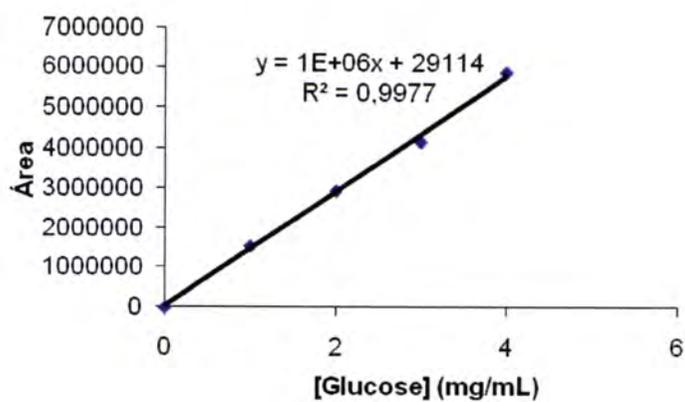
Anexo D

Curvas de Calibração Padrão

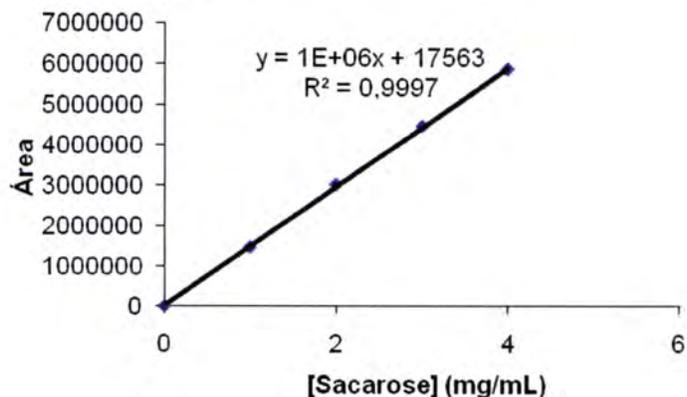
curva de calibração (Frutose)



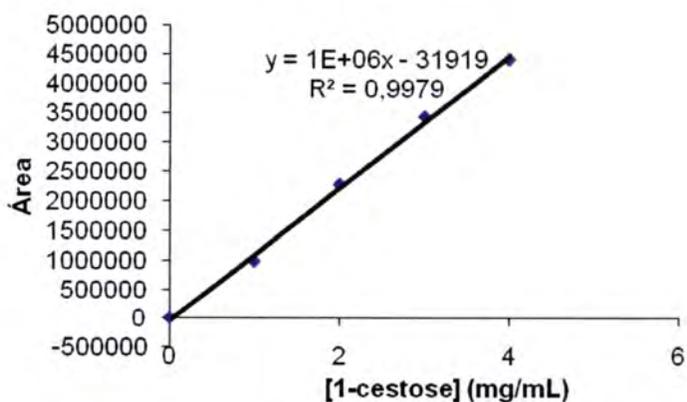
curva de calibração (Glucose)



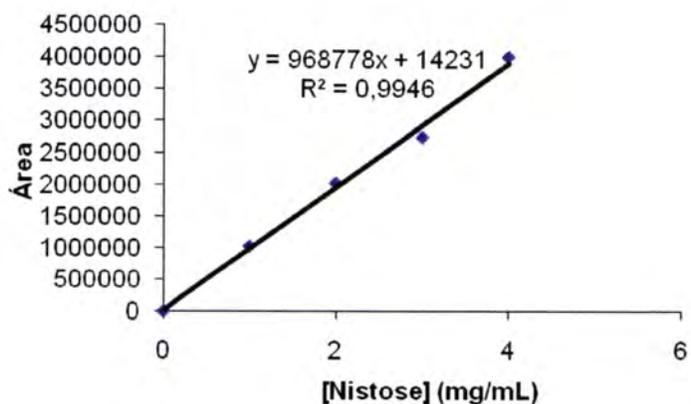
curva de calibração (Sacarose)



curva de calibração (1-cestose)

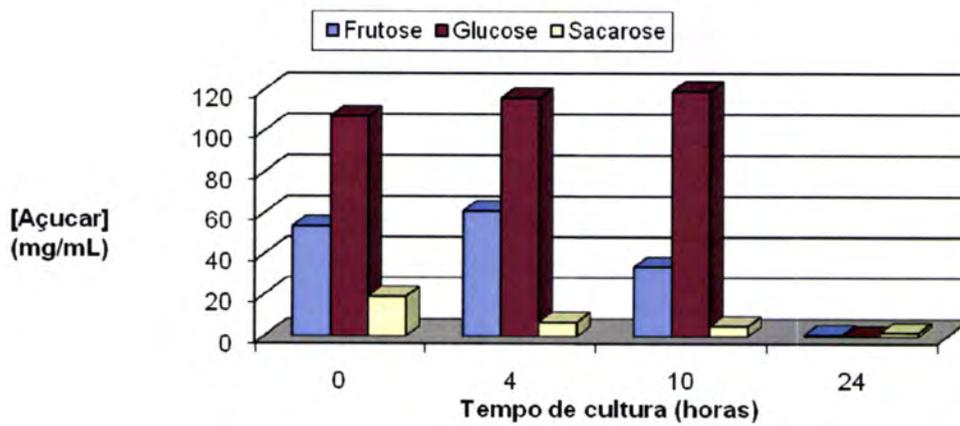


curva de calibração (Nistose)

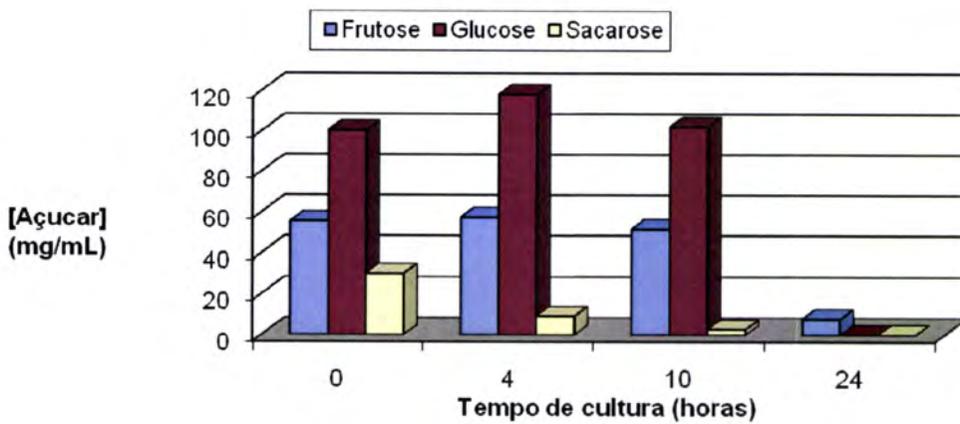


Concentração de Frutose, Glucose e Sacarose em meio de sacarose 20% e 80% sumo de laranja

A-Estirpe *v. lab.*



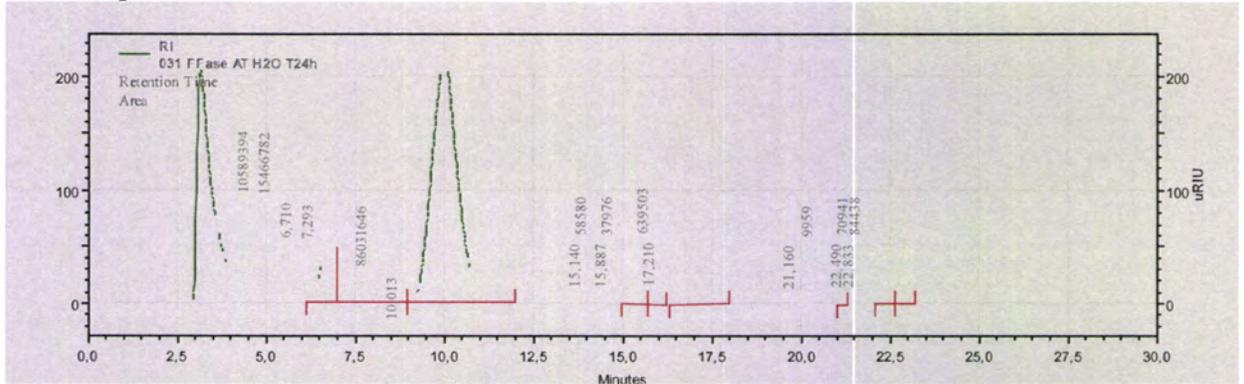
B- Estirpe *S. cerevisiae* 336



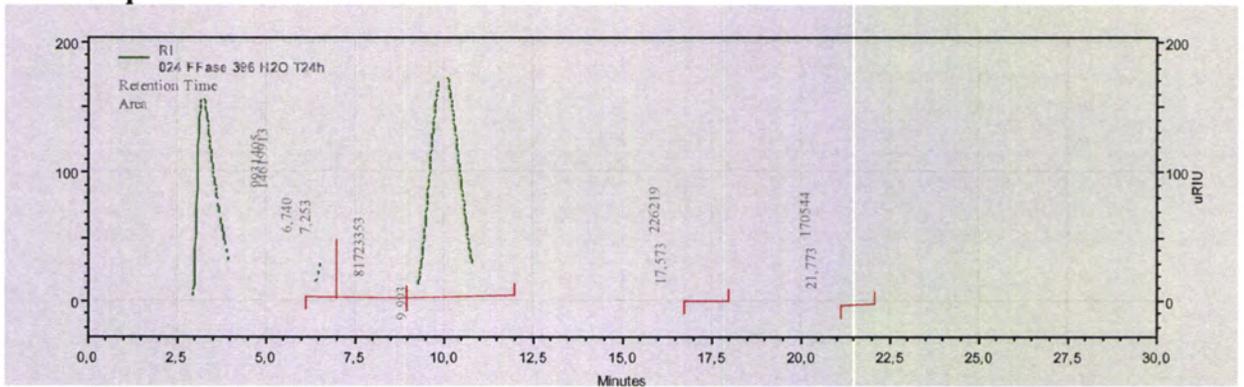
Presença de FFase em meio de cultura de sacarose 20% e água

I- Vaso agitado

A-Estirpe v. lab.

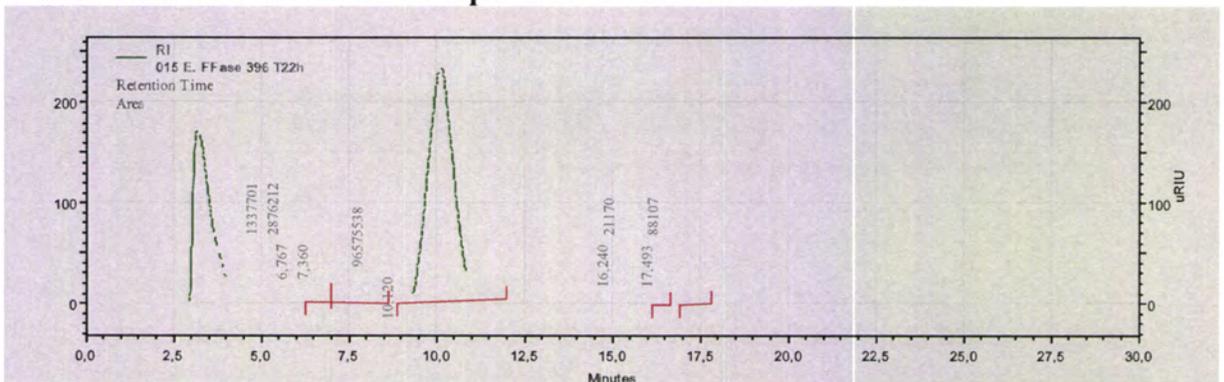


B- Estirpe *S. cerevisiae* 336



Presença de FFase em meio de cultura de sacarose 20% e 80% sumo de laranja

Cultura em biorreator da estirpe *S. cerevisiae* 336



Determinação da glucose nas amostras após o ensaio da frutossiltransferase, através de um kit enzimático

1 – Sobrenadante das culturas

	Glucose (mg/mL)
396 (12 h)	0,360963
AT (12 h)	0,284403
396 (24 h)	0,513561
AT (24 h)	0,543489

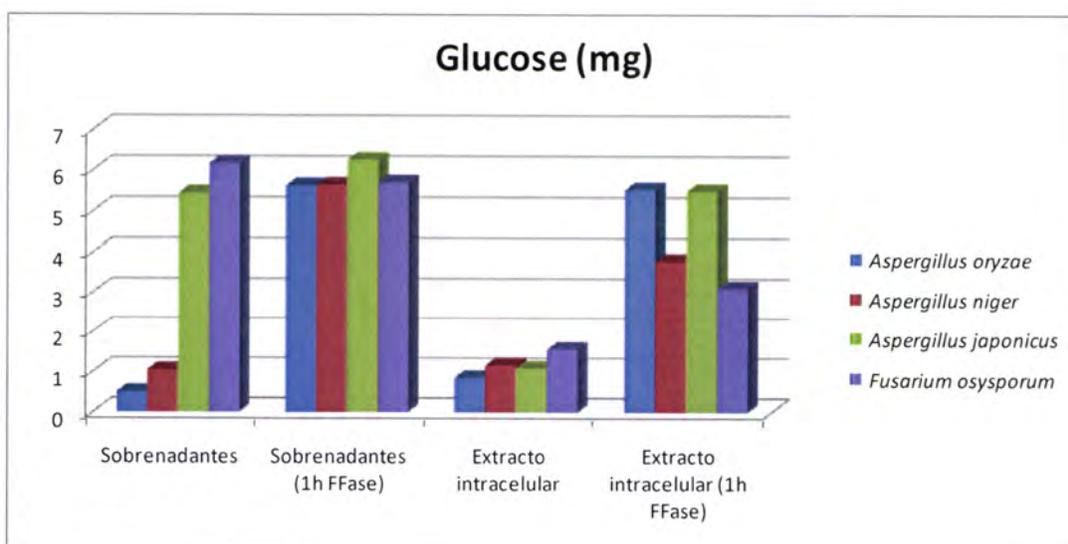
2 – Fracções intracelulares

	Glucose (mg/mL)
396 (24 h)	0,03170976
AT (24 h)	0,02692824

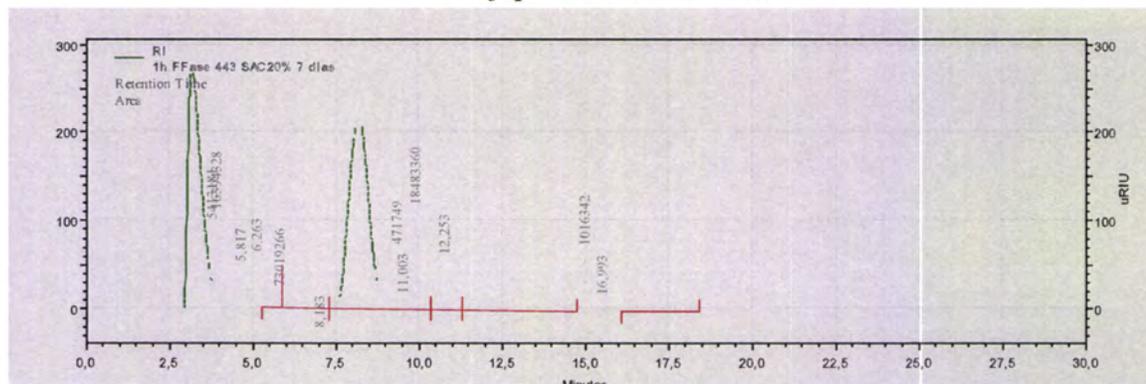
Anexo E

Quantificação da glucose através de Kit enzimático

Estirpes	Glucose (mg)			
	Sobrenadantes	Sobrenadantes (1h FFase)	Extracto intracelular	Extracto intracelular (1h FFase)
<i>Aspergillus oryzae</i> (125)	0,490566038	5,622641509	0,85495283	5,524764151
<i>Aspergillus niger</i> (296)	1,047169811	5,632075472	1,165768194	3,78032345
<i>Asperillus japonicus</i> (443)	5,433962264	6,25	1,087680355	5,488346282
<i>Fusarium oxysporum</i> (866)	6,160377358	5,693396226	1,559748428	3,094339623



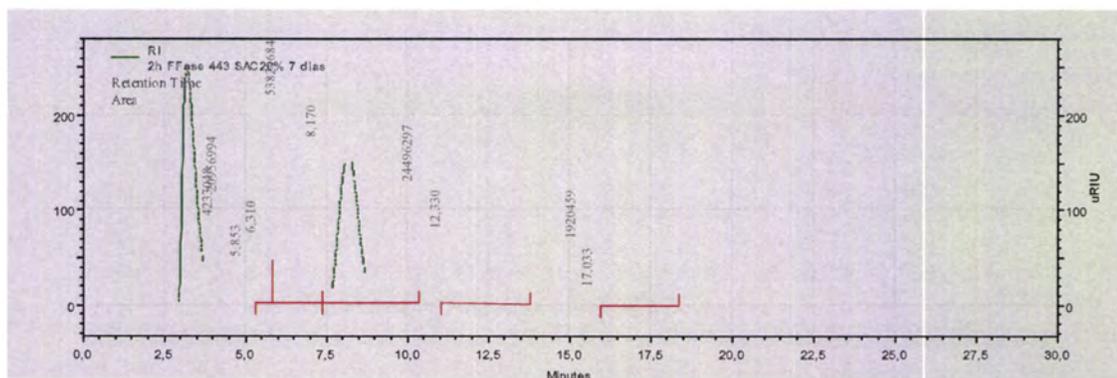
Cromatogramas e quantificação de fruto-oligossacáridos obtidos relativos à estirpe *Aspergillus japonicus* CCM1 443.



1h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		1h
5,817	5413181	4,72	276610	10,05	Frutose	5413181
6,263	16394328	14,28	367665	13,36	Glucose	16394328
8,183	73019266	63,61	1721506	62,55	Sacarose	73019266
11,003	471749	0,41	10146	0,37	Kestose	18483360
12,253	18483360	16,1	360352	13,09	Nistose	1016342
16,993	1016342	0,89	15747	0,57		

Totals 114798226 100 2752026 100

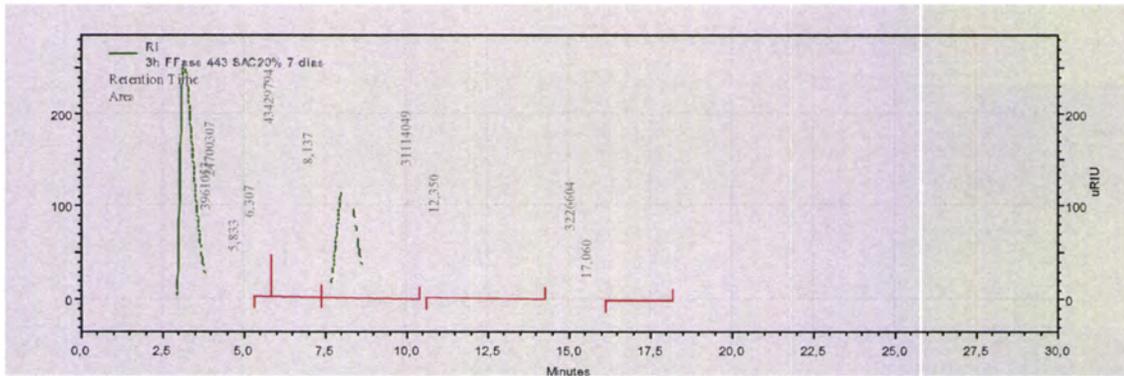


2h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		2h
5,853	4233048	4,01	260696	10,29	Frutose	4233048
6,31	20956994	19,88	468370	18,48	Glucose	20956994
8,17	53829684	51,05	1269743	50,11	Sacarose	53829684
12,33	24496297	23,23	500506	19,75	Kestose	24496297
17,033	1920459	1,82	34521	1,36	Nistose	1920459

Totals 105436482 100 2533836 100

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

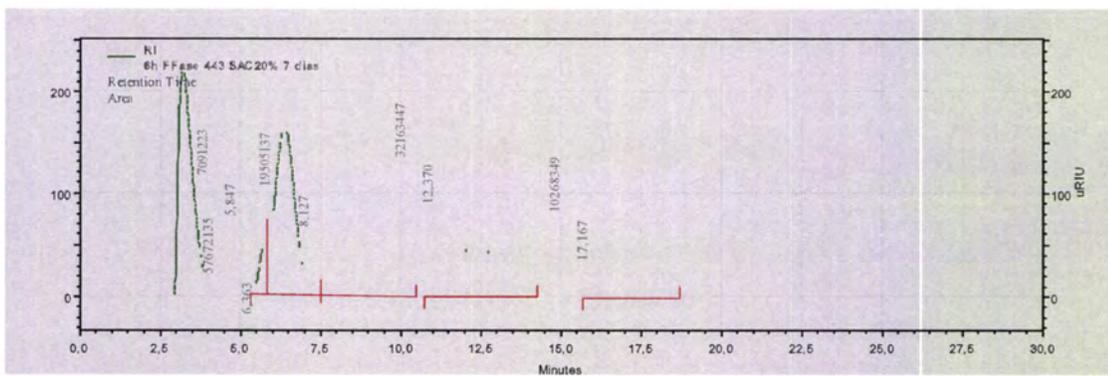


3h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		3h
5,833	3961053	3,72	260004	10,39	Frutose	3961053
6,307	24700307	23,21	557121	22,26	Glucose	24700307
8,137	43429794	40,81	1021991	40,84	Sacarose	43429794
12,35	31114049	29,23	602415	24,07	Kestose	31114049
17,06	3226604	3,03	60939	2,44	Nistose	3226604

Totals

106431807 100 2502470 100



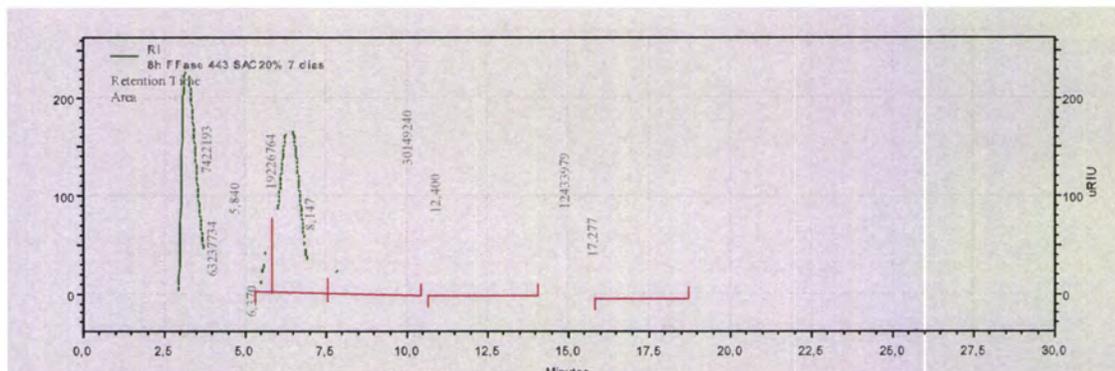
6h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		6h
5,847	7091223	5,6	479843	15,99	Frutose	7091223
6,363	57672135	45,52	1321883	44,05	Glucose	57672135
8,127	19505137	15,39	412159	13,73	Sacarose	19505137
12,37	32163447	25,39	603109	20,1	Kestose	32163447
17,167	10268349	8,1	183970	6,13	Nistose	10268349

Totals

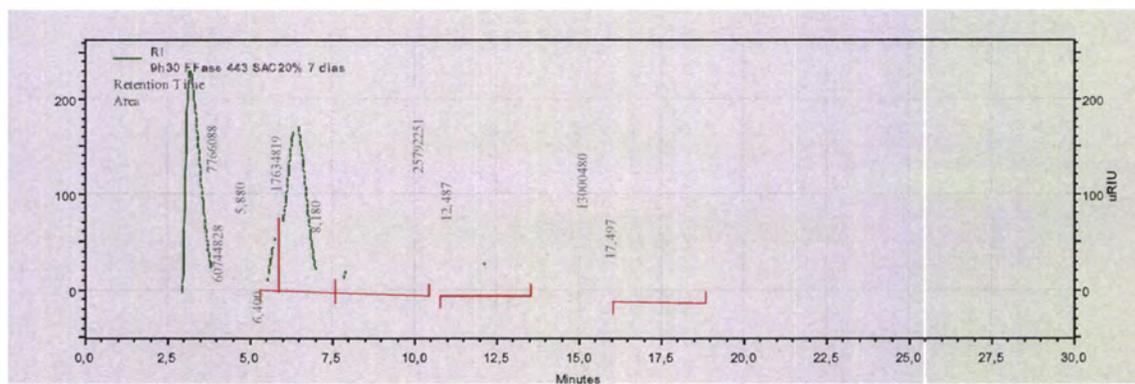
126700291 100 3000964 100

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos



8h 443

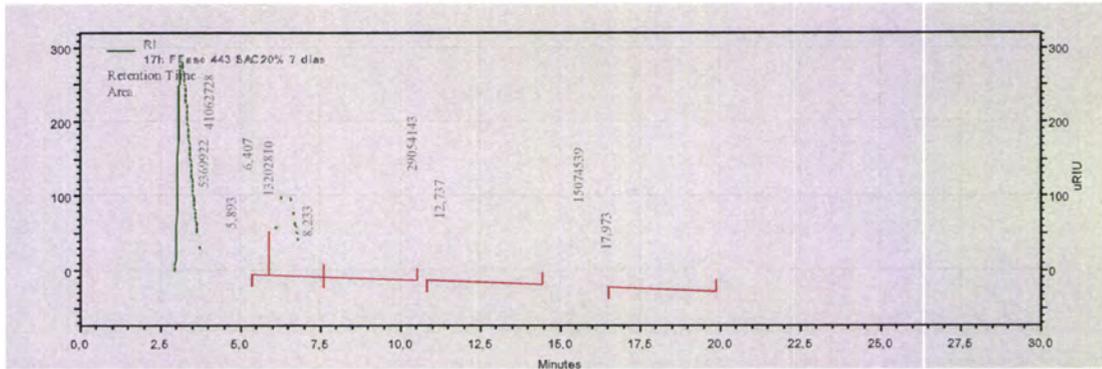
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		8h
5,84	7422193	5,6	513461	16,44	Frutose	7422193
6,37	63237734	47,74	1435886	45,99	Glucose	63237734
8,147	19226764	14,51	400095	12,81	Sacarose	19226764
12,4	30149240	22,76	549638	17,6	Kestose	30149240
17,277	12433979	9,39	223255	7,15	Nistose	12433979
Totals	132469910	100	3122335	100		



9h30 443

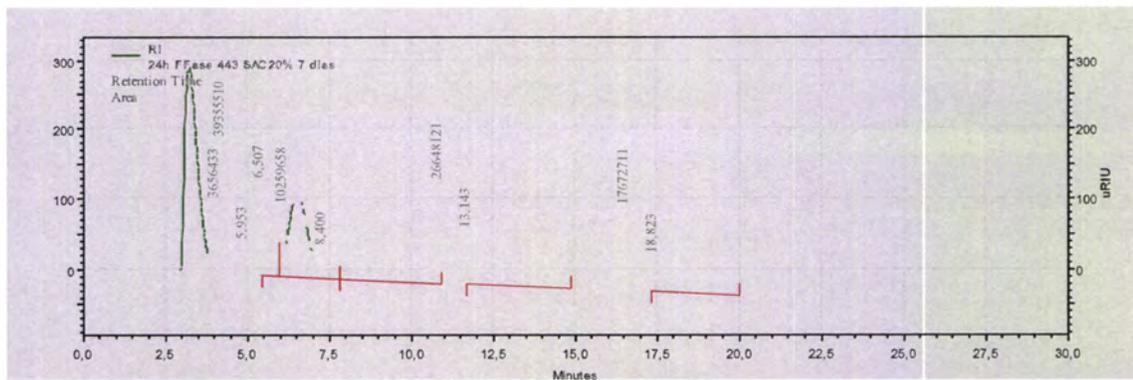
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		9h30
5,88	7766088	6,22	513331	16,93	Frutose	7766088
6,4	60744828	48,62	1423229	46,95	Glucose	60744828
8,18	17634819	14,11	378162	12,47	Sacarose	17634819
12,487	25792251	20,64	489441	16,14	Kestose	25792251
17,497	13000480	10,41	227493	7,5	Nistose	13000480
Totals	124938466	100	3031656	100		

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos



17h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		17h
5,893	5369922	5,18	352180	14,54	Frutose	7766088
6,407	41062728	39,57	985683	40,7	Glucose	60744828
8,233	13202810	12,72	288324	11,91	Sacarose	17634819
12,737	29054143	28	536819	22,17	Kestose	25792251
17,973	15074539	14,53	258591	10,68	Nistose	13000480
Totals	103764142	100	2421597	100		



24h 443

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %		24h
5,953	3656433	3,75	245642	11,12	Frutose	3656433
6,507	39355510	40,33	948909	42,94	Glucose	39355510
8,4	10259658	10,51	232307	10,51	Sacarose	10259658
13,143	26648121	27,31	495605	22,43	Kestose	26648121
18,823	17672711	18,11	287402	13,01	Nistose	17672711
Totals	97592433	100	2209865	100		

Tabela de integração

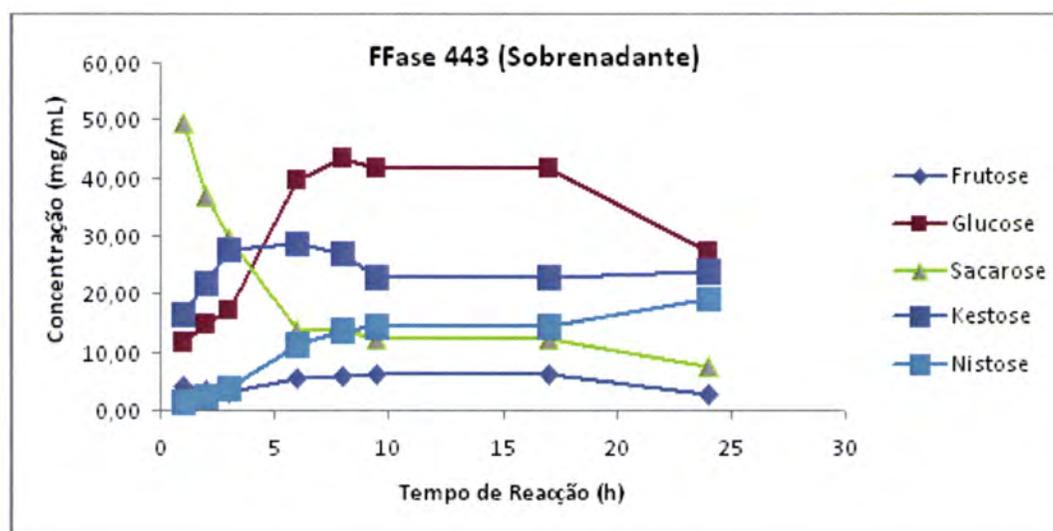
Width	0	30	0,2
Threshold	0	30	800
Integration Off	0	5	0

Optimização das condições de cultura da *Saccharomyces cerevisiae* e de outros fungos produtores de oligossacáridos

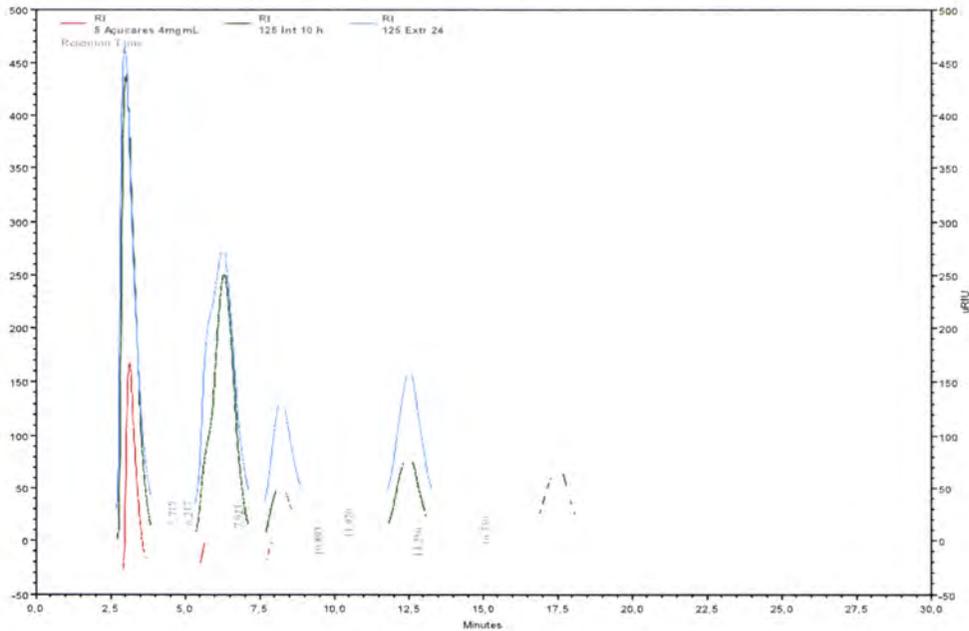
Shoulder Sensitivity	5,424	7,451	200
Integration Off	20	30	0

Frutose	$y = 1281754,100000x - 1755,266667$		Sacarose (mg) no ensaio FFase
Glucose	$y = 1464959,726667x - 353312,600000$	100,90	100
Sacarose	$y = 1493388,173333x - 945451,200000$		
Kestose	$y = 1117710,093333x + 102274,666667$		
Nistose	$y = 927712x - 143867$		
		M (Glu) = 180,16g/mol	
		M (Fru) = 180,16g/mol	
		M (Kes) = 504,44g/mol	

	1h	2h	3h	6h	8h	9h30	17h	24h
Frutose	5413181	4233048	3961053	7091223	7422193	7766088	7766088	3656433
Glucose	16394328	20956994	24700307	57672135	63237734	60744828	60744828	39355510
Sacarose	73019266	53829684	43429794	19505137	19226764	17634819	17634819	10259658
Kestose	18483360	24496297	31114049	32163447	30149240	25792251	25792251	26648121
Nistose	1016342	1920459	3226604	10268349	12433979	13000480	13000480	17672711
Tempo	1	2	3	6	8	9,5	17	24
Frutose	4,22	3,30	3,09	5,53	5,79	6,06	6,06	2,85
Glucose	11,43	14,55	17,10	39,61	43,41	41,71	41,71	27,11
Sacarose	49,53	36,68	29,71	13,69	13,51	12,44	12,44	7,50
Kestose	16,45	21,82	27,75	28,68	26,88	22,98	22,98	23,75
Nistose	1,25	2,23	3,63	11,22	13,56	14,17	14,17	19,20
Soma dos glúcidos	82,88	78,58	81,29	98,75	103,15	97,36	97,36	80,42
Soma dos FOS	17,70	24,05	31,38	39,91	40,44	37,15	37,15	42,96
	60	120	180	360	480	570	1320	1440
	11,43	14,55	17,10	39,61	43,41	41,71	41,71	27,11
	63,455544	80,743141	94,926271	219,85403	240,94167	231,49624	231,49624	150,45373
	1,0575924	0,6728595	0,5273682	0,6107057	0,5019618	0,4061337	0,1753759	0,1044818
	4,2246296	3,3039124	3,0917071	5,5338058	5,7920223	6,0603225	6,0603225	2,8540484
	0,390822	0,1528231	0,0953383	0,0853224	0,0669778	0,059015	0,0254838	0,0110012
FOS/Totais ACU	0,2135104	0,3060629	0,3860262	0,4041544	0,3920621	0,3815992	0,3815992	0,5341474
	1	2	3	6	8	9,5	17	24
Actividade Ffase	1,0575924	0,6728595	0,5273682	0,6107057	0,5019618	0,4061337	0,1753759	0,1044818

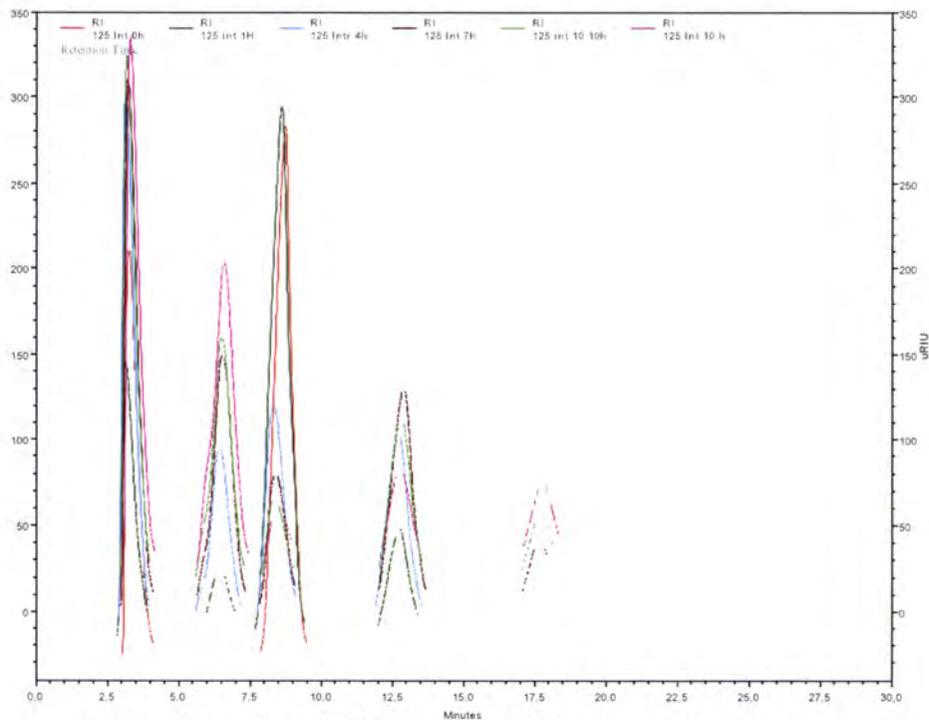


Perfil de alguns cromatogramas das amostras intracelular e extracelular da estirpe *Aspergillus oryzae* CCMI 125.

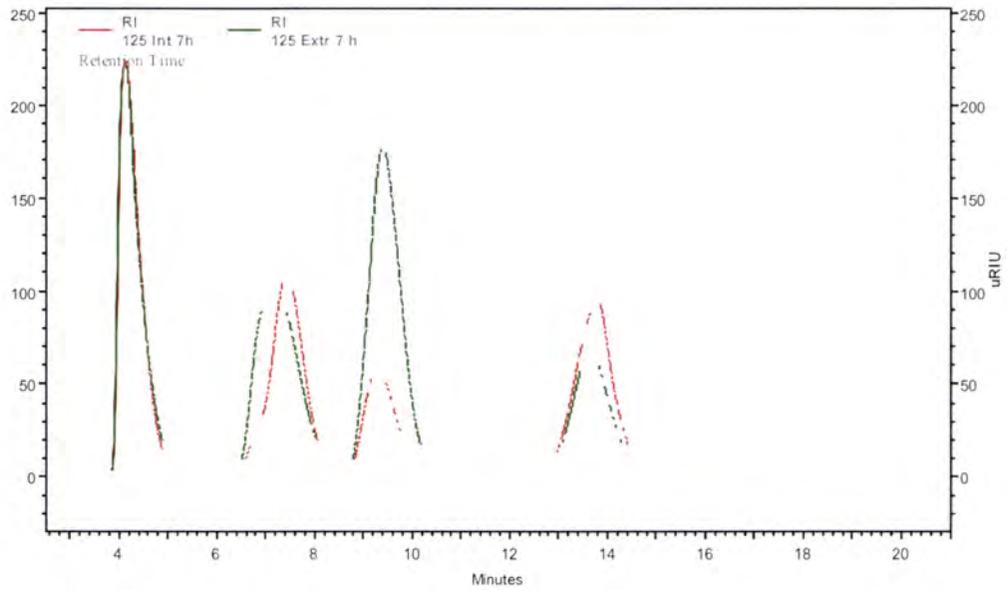


Cromatogramas relativos a:

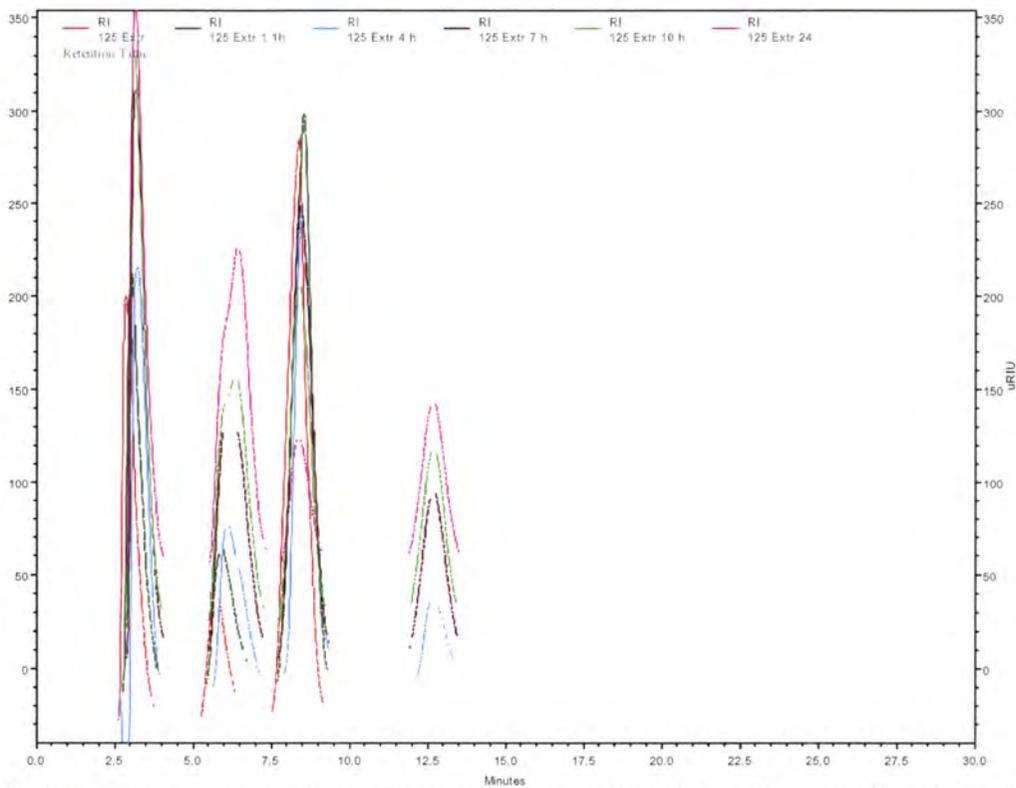
Vermelho = 5 Padrões de glúcidos: Pico do solvente, frutose, glucose, cestose, nistose,
Verde = 125 Intracelular 24 H ;Turquesa = 125 Extracelular 24 H



Cromatogramas da estirpe *Aspergillus oryzae* CCMI 125 relativamente à amostra intracelular nos tempos de incubação enzimática de 0h, 1h, 4h, 7h, 10h, 24h a 40°C: 0 h vermelho 1 h verde 4 h turquesa 7 h castanho 10 h verde alface 24 h rosa



Cromatograma da estirpe *Aspergillus oryzae* CCMI 125: intr e extra às 7 h



Perfil dos cromatogramas relativamente à amostra extracelular: 0 h vermelho 1 h verde 4 h turquesa 7 h castanho 10 h verde alface 24 h rosa

