

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

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS
POR *Zymomonas mobilis*

Andréa Vasconcelos Lobato

RECIFE - 2003

Andréa Vasconcelos Lobato

PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS
POR *Zymomonas mobilis*

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

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

Recife – 2003

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

VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Ana Maria Santos Cabral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

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

Professora Dra. Alda de Andrade Chiappeta

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

Professora Dra. Juliana Ferreira Cavalcanti

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

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs, meus maiores incentivadores.

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

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

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

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

Aos professores do mestrado por repassarem seus conhecimentos.

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP (Degree of Polymerization) \Rightarrow Grau de polimerização

CLAE \Rightarrow Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ART \Rightarrow Açúcares Redutores Totais

ML \Rightarrow Meio de produção de levana

MPF \Rightarrow Meio de pré-fermentação

SSDL \Rightarrow Meio Standard de Swings & De Ley

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TF \Rightarrow Tempo de fermentação

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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