

Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Transformação Microbiana de Sacarose e Glicose em  
Eritritol por *Trichosporonoides sp*

Parcer

Este exemplar corresponde a redação  
final da Tese defendida por Marina  
Ayako Yabuuti Aoki e aprovada  
pela Comissão Julgadora em  
03.11.93.

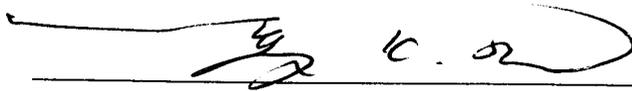
Marina Ayako Yabuuti Aoki   
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Yong Kun Park   
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

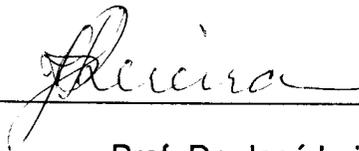
1993

Banca Examinadora



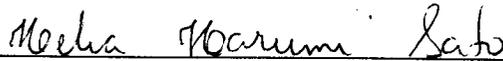
---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador



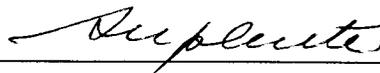
---

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
Membro



---

Profª Dra. Hélia Harumi Sato  
Membro



---

Prof. Dr. Morris William Montgomery  
Membro

Campinas, 03 de novembro de 1993.

**Dedico,**

**Aos meus pais, por tudo que sonharam e fizeram  
por mim, Kinue (in memoriam) e Masaru**

**Ao meu companheiro de todos  
os momentos, Edson**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orientação deste trabalho e exemplo de dedicação científica.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Hélia Harumi Sato, pela paciência e intensa colaboração em todas as etapas deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Gláucia Maria Pastore, pelo ombro amigo das horas difíceis, apoio e colaboração nas análises de HPLC.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Departamento de Ciência de Alimentos, que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Aos colegas Regina, Yim, Roseli, Roberto e Angelita pelo companheirismo e colaboração.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica de Alimentos Dora, Eliane e Paulo pelos auxílios prestados.

À ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação), pelas cópias deste trabalho.

À todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

## ÍNDICE:

	página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	vii
RESUMO .....	viii
SUMMARY .....	ix
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1- Propriedades físico-químicas, fisiológicas e aplicações práticas do eritritol ..	3
2.1.1- Propriedades físico-químicas .....	3
2.1.2- Características fisiológicas .....	6
2.1.3- Considerações sobre aplicação do eritritol em tecnologia de alimentos .....	7
2.2- Métodos de obtenção de eritritol .....	9
2.2.1- Síntese química do eritritol .....	10
2.2.2- Síntese microbiana do eritritol .....	11
2.3- Biossíntese de eritritol .....	12
2.4- Processo de produção microbiana de eritritol .....	14
2.4.1- Condições de cultura .....	14
2.4.1.1- Composição do meio de cultura .....	14
2.4.1.1.1- Fontes de carbono .....	14
2.4.1.1.2- Fontes de nitrogênio .....	15
2.4.1.1.3- Cloreto de sódio e potássio .....	17
2.4.1.1.4- Vitaminas, fosfato e outros sais inorgânicos .....	17
2.4.1.2- Aeração .....	18
2.4.1.3- Temperatura .....	18
2.4.1.4- pH .....	19
2.4.2- Produção de eritritol em larga escala .....	19
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1- Material .....	20
3.1.1- Reagentes e materiais específicos .....	20
3.1.2- Equipamentos .....	21
3.2- Métodos .....	21
3.2.1- Isolamento e seleção de microrganismos produtores de eritritol .....	21
3.2.1.1- Coleta de amostras .....	21

3.2.1.2- Seleção e isolamento de microrganismos osmofílicos .....	22
3.2.1.3- Seleção preliminar de microrganismos produtores de eritritol.....	22
3.2.1.4- Cromatografia descendente de açúcares em papel.....	22
3.2.1.5- Seleção de microrganismos produtores de níveis elevados de eritritol.....	23
3.2.1.6- Seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol .....	23
3.2.1.7- Cromatografia líquida de alta eficiência(HPLC) .....	23
3.2.2- Identificação da linhagem produtora de eritritol selecionada.....	24
3.2.2.1- Características das células vegetativas.....	24
3.2.2.1.1- Morfologia das células vegetativas.....	24
3.2.2.1.2- Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, conidiosporos, blastosporos e artrosporos .....	24
3.2.2.2- Características sexuais: formação de asco e ascosporo .....	25
3.2.2.3- Características fisiológicas e bioquímicas .....	25
3.2.2.3.1- Utilização de compostos de carbono.....	25
3.2.2.3.1.1- Fermentação de carboidratos .....	25
3.2.2.3.1.2- Assimilação de compostos de carbono .....	26
3.2.2.3.2- Assimilação de compostos nitrogenados: nitrato de potássio .....	26
3.2.2.3.3- Teste de Diazonium Blue B (DBB) .....	26
3.2.2.3.4- Teste da atividade de urease .....	27
3.2.3- Conservação da linhagem produtora de eritritol selecionada.....	27
3.2.4- Estudo da relação entre tempo de fermentação, temperatura de fermentação e produção de eritritol utilizando os substratos glicose e sacarose nos meios de cultura para produção de eritritol por <i>Trichosporonoides sp</i> .....	27
3.2.4.1- Preparação do inóculo .....	27
3.2.4.2- Fermentação .....	28
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1- Isolamento e seleção de microrganismos.....	29
4.1.1- Isolamento e seleção preliminar de microrganismos produtores de eritritol.....	29

4.1.2- Seleção preliminar de microrganismos produtores de níveis elevados de eritritol.....	29
4.1.3- Seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol.....	29
4.2- Identificação da linhagem melhor produtora de eritritol .....	30
4.3- Estudo do efeito da temperatura de fermentação na produção de eritritol a partir dos substratos glicose e sacarose por <i>Trichosporonoides sp.</i> .....	31
4.4- Estudo comparativo da cinética de transformação dos substratos glicose e sacarose em eritritol.....	32
5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	56
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS:

	página
Figura 1 - Cromatografia em papel ilustrando o perfil de utilização dos substratos glicose e sacarose e formação dos produtos pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C .....	34
Figura 2 - Cromatografia em papel ilustrando o perfil de utilização dos substratos glicose e sacarose e formação dos produtos pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C .....	35
Figura 3 - Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato sacarose pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C.....	36
Figura 4 - Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato glicose pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C.....	37
Figura 5 - Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato sacarose pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C.....	38
Figura 6 - Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato glicose pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C.....	39
Figura 7 - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol e glicerol pelas linhagens 331-1 e 150-5 durante a fermentação a 30°C .....	40
Figura 8 - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol e glicerol pelas linhagens 331-1 e 150-5 durante a fermentação a 30°C .....	41
Figura 9 - <i>Trichosporonoides sp</i> em meio ágar YM após 120 horas de incubação .....	42

Figura 10 - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol e glicerol por *Trichosporonoides sp* durante a fermentação a 25°C , 30°C e 35°C ... 43

Figura 11 - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol e glicerol por *Trichosporonoides sp* durante a fermentação a 25°C , 30°C e 35°C ... 44

Figura 12 - Cinética de transformação do substrato glicose por *Trichosporonoides sp* e seu crescimento celular durante a fermentação a 30°C ..... 45

Figura 13 - Cinética de transformação do substrato sacarose por *Trichosporonoides sp* e seu crescimento celular durante a fermentação a 30°C ..... 46

## ÍNDICE DE TABELAS:

	página
Tabela 1 - Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de reprodução da linhagem <i>Trichosporonoides sp</i> .....	48
Tabela 2 - Fermentação do substrato glicose por <i>Trichosporonoides sp</i> a 25°C, 30°C e 35°C - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol, glicerol, glicose e frutose, e crescimento celular .....	49
Tabela 3 - Fermentação do substrato sacarose por <i>Trichosporonoides sp</i> a 25°C, 30°C e 35°C - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol, glicerol, glicose e frutose, e crescimento celular.....	50

## ÍNDICE DE ANEXOS:

	página
Anexo 1- Meio ágar YM .....	52
Anexo 2- Meio ágar CMA.....	52
Anexo 3- Meio ágar acetato de FOWELL.....	52
Anexo 4- Meio ágar acetato de McCLARY .....	53
Anexo 5- Meio levedura autolizada.....	53
Anexo 6- Coloração de esporos .....	53
Anexo 7- Fermentação de composto de carbono.....	54
Anexo 8- Meio de assimilação de nitrato .....	54
Anexo 9- Meio ágar GYP .....	55
Anexo 10- Meio ágar uréia.....	55

## **RESUMO:**

Quatrocentos e duas linhagens de leveduras osmofílicas foram isoladas de amostras de flores, mel, colméias e favos e testadas quanto à capacidade de produzir eritritol. Foram selecionadas vinte e duas linhagens de leveduras osmofílicas das quais duas delas produziram quantidades excepcionalmente elevadas de eritritol. Entre estas, a linhagem identificada como *Trichosporonoides sp* apresentou melhor produtividade de eritritol.

Estudou-se o efeito da temperatura sobre a fermentação e produção de eritritol; a fermentação a 30-35°C apresentou bons rendimentos tanto no substrato glicose como sacarose.

Do estudo comparativo das cinéticas de transformação dos substratos glicose e sacarose em eritritol, durante a fermentação por *Trichosporonoides sp*, verificou-se que a glicose é a fonte de carbono mais apropriada.

## **SUMMARY:**

Four hundred and two strains of osmophilic yeasts were isolated from flowers, honey, beehive and honeycomb samples and examined for erythritol producing ability. Twenty two strains were found to be erythritol producers and two of these produced exceptionally high quantities. Of these, the strain which was classified as *Trichosporonoides sp* demonstrated the highest erythritol yield.

The effect of temperature on the time course and erythritol yield was performed; the fermentation at 30°C and 35°C showed good results in both glucose and sucrose substrate.

Comparative study of time course using glucose and sucrose substrate by *Trichosporonoides sp* at 30°C indicated that glucose was the carbon source more appropriate than sucrose for erythritol production.

## 1- INTRODUÇÃO

O meso-eritritol conhecido como eritritol, foi reportado pela primeira vez em 1874 por HOFFMANN (citado por SASAKI, 1988); é um álcool poliídrico constituído de 4 carbonos cuja estrutura química está apresentada na figura I.

Encontra-se amplamente distribuído na natureza (tabela I) e está presente na alimentação do homem desde os tempos antigos. As características básicas que fazem do eritritol um adoçante alternativo são o seu poder edulcorante, baixo valor calórico e não cariogênico. Porém, o que o destaca dos demais adoçantes são as suas características físico-químicas e fisiológicas únicas, que o tornam potencialmente úteis para serem empregados isoladamente ou associados a outros adoçantes a fim de obter produtos com qualidades sensoriais e tecnológicas mais próximas possíveis dos produtos elaborados com sacarose, para desenvolvimento de novos produtos e até mesmo para amenizar o efeito laxante característico dos polióis.

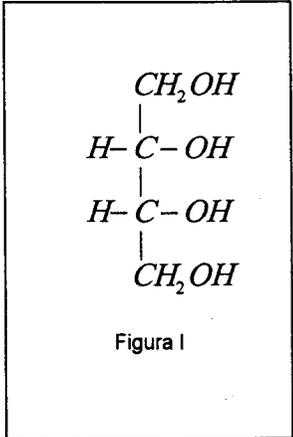


Figura I

Tabela I - Distribuição de eritritol na natureza (ODA et alii, 1993)

liquens	3 - 50 mg /g
cogumelo	20-40 mg /g
melão	0,022 - 0,047 mg /g
pera	0 - 0,040 mg /g
uva	0- 0,042 mg /g
vinho	170 - 300 mg /l
saquê	150-180 mg /l
molho de soja	910 mg /l
esperma de boi	69 mg /g
soro humano	0,045 mg /g
urina humana	1,6 - 3,3 mg /h

O eritritol, encontrado em pequenas concentrações na natureza, pode ser sintetizado quimicamente ou via transformação microbiana. Para a obtenção de eritritol via transformação microbiana, foram isolados muitos microrganismos osmofílicos capazes de produzir eritritol; porém, até recentemente, fatores como o baixo rendimento

e principalmente, a produção paralela de outros polióis tais como glicerol, ribitol cujas presenças dificultam a etapa de purificação do eritritol, desestimularam empresas como a "Corn Products Company", a produzirem em larga escala. A síntese química requer, invariavelmente, condições de temperatura e pressão elevadas, além disso a formação de produtos paralelos inviabilizam a industrialização do produto. Frente a estes obstáculos e devido às relativas facilidades na síntese química de outros adoçantes, entre eles os polióis xilitol, sorbitol, as pesquisas com eritritol só receberam novos impulsos com o advento da engenharia genética e com a crescente procura por adoçantes alternativos. Desde então, intensificaram-se as pesquisas para isolamento de linhagens com elevada capacidade de conversão do substrato em eritritol; de preferência, isento de produtos paralelos, e com características adequadas para produção em larga escala. Concomitantemente, têm-se realizado muitos estudos das propriedades físico-químicas do eritritol, seus aspectos nutricionais, fisiológicos e suas implicações, e suas aplicações práticas.

Segundo ODA et alii (1989), o Japão é o pioneiro na viabilização industrial do eritritol através do processo microbiano e é atualmente, o único país a produzi-lo comercialmente.

Dentro deste contexto, foram definidos como principais objetivos deste trabalho:

1. Isolar e selecionar um microrganismo produtor de elevadas concentrações de eritritol como único álcool poliídrico, preferencialmente.
2. Estudar o efeito da temperatura de fermentação na produção de eritritol a partir dos substratos glicose e sacarose.
3. Comparar a cinética de transformação dos substratos glicose e sacarose em eritritol.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E APLICAÇÕES PRÁTICAS DO ERITRITOL

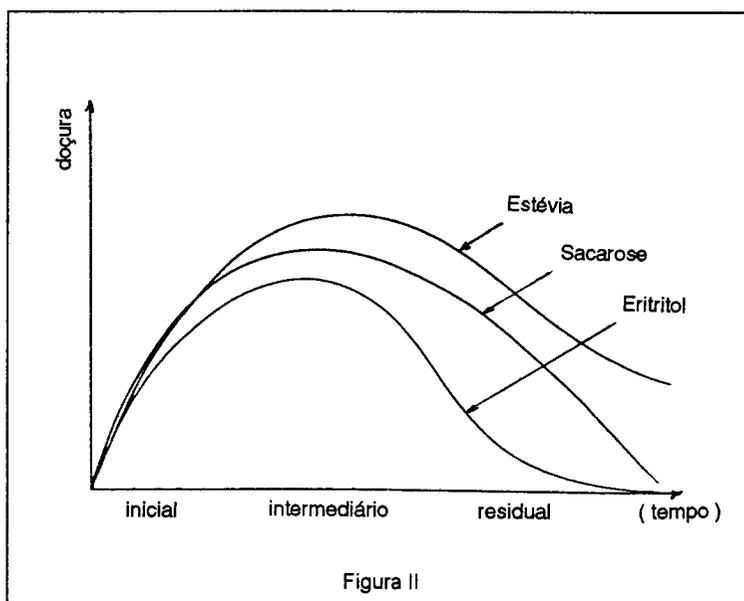
#### 2.1.1- Propriedades físico-químicas

##### a. Poder edulcorante

O poder edulcorante do eritritol, quando comparado com a de uma solução de sacarose à 10%, é de cerca de 70 - 80%; em relação à outros polióis, seu poder edulcorante é maior que o de sorbitol e equipara-se com o de maltitol.

De acordo com ODA et alii (1993), na faixa de temperatura entre 5 e 55°C o poder edulcorante do eritritol mantém-se constante; porém, em temperaturas superiores a 55°C, esse poder pode ser reduzido de até 90%.

Em 1991, ODA e OKUBO (citado por ODA et alii, 1993) realizaram um estudo comparativo do sabor residual ("after taste") entre eritritol, sacarose e estévia (figura II) e verificaram que o eritritol é o único a apresentar sabor doce residual de baixa intensidade que resulta num sabor doce leve; em contrapartida, adoçantes como estévia,



sacarina, aspartame, "glycyrrhizin", apresentam sabor doce residual maior que o da sacarose e portanto, mais persistente. Dessa maneira, os pesquisadores obtiveram, da combinação do eritritol (que apresenta sabor doce residual baixo) com adoçantes de elevado sabor doce residual, um adoçante composto de elevado poder edulcorante e efeito residual doce de ótima intensidade (tabela II).

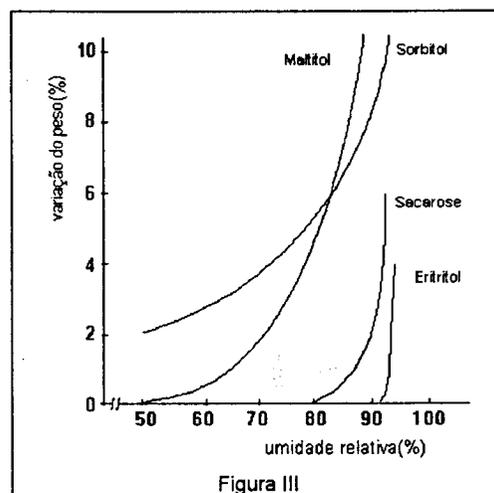
Tabela II - Associação de eritritol com alguns adoçantes de elevado poder edulcorante.  
(ODA et alii, 1993)

doçante	g/g de eritritol
aspartame	0,001 ~ 0,004
"glycyrrhizin"	0,001 ~ 0,004
estévia	0,001 ~ 0,004
sacarina	0,0004 ~ 0,001

Os pesquisadores verificaram também que a adição de eritritol à sacarose em concentrações superiores a 20%, resulta num adoçante com sabor doce residual menos persistente e poder edulcorante de boa intensidade.

#### b. Higroscopicidade

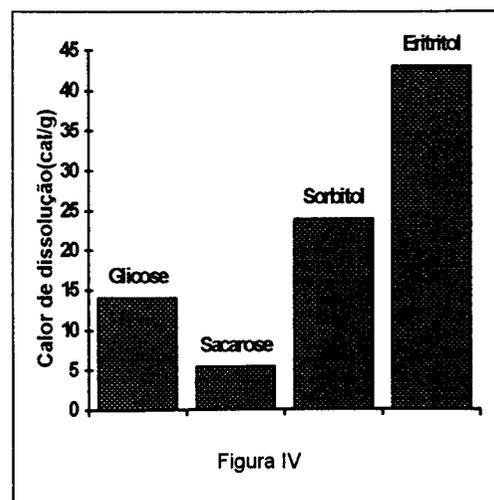
ODA e OKUBO (citado por ODA et alii, 1993) realizaram um estudo comparativo, quanto à higroscopicidade, dos adoçantes sorbitol, maltitol, sacarose e eritritol (figura III) e constataram que o eritritol é um adoçante de baixa higroscopicidade (menos higroscópico que a sacarose).



#### c. Caráter endotérmico

A dissolução do eritritol em água é uma reação endotérmica.

Em 1991, ODA e OKUBO (citado por ODA et alii, 1993), realizaram um estudo comparativo da energia térmica absorvida na dissolução de glicose, sacarose, sorbitol e eritritol em água



(figura IV) e verificaram que a energia absorvida na dissolução de eritritol em água é

relativamente elevada (cerca de 2 vezes e 3 vezes maior que a necessária na dissolução de sorbitol e glicose, respectivamente).

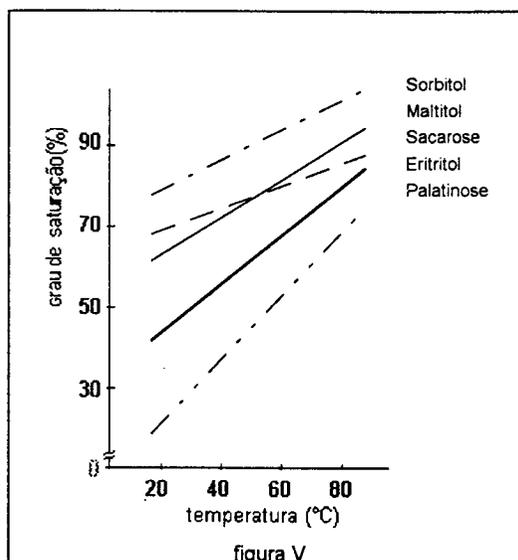
#### d. Termoresistência

O eritritol, assim como o sorbitol, manitol e outros álcoois poliidricos, devido à ausência de grupos carbonil livres, não sofrem reações de Maillard característicos em produtos assados.

Segundo ODA et alii (1988), a decomposição do eritritol após aquecimento do produto a 200°C durante 1 hora, é praticamente imperceptível.

#### e. Solubilidade

ODA e OKUBO (citado por ODA et alii, 1993) estudaram a solubilidade de eritritol e compararam com a de sacarose, sorbitol, maltitol e palatinose (figura V) e verificaram que na faixa de temperatura entre 20 - 80°C, a concentração de saturação de uma solução de sacarose varia muito pouco quando comparada com a de eritritol; à temperatura ambiente, o grau de saturação de uma solução de eritritol é de cerca de 35% (p/p).



#### f. Atividade de água

De acordo com ODA et alii (1993), a atividade de água de uma solução saturada de eritritol, a 25°C, é de 0.91; devido à sua baixa solubilidade, seu efeito no abaixamento da atividade de água é muito pequeno não tendo portanto, propriedades preservativas.

#### g. Abaixamento do ponto de solidificação

ODA et alii (1993) verificaram que o ponto de solidificação de uma solução de eritritol à 20% (p/p) é de  $-4,1^{\circ}\text{C}$ ; esta redução é consideravelmente grande quando comparada com o abaixamento do ponto de solidificação observado em solução de sacarose e sorbitol (respectivamente,  $-1,2^{\circ}\text{C}$  e  $-2,5^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.1.2- Características fisiológicas

#### a. Valor calórico, efeito laxante e formação de gases intestinais

De acordo com os estudos realizados pelo Centro de Análise de Alimentos do Japão (Nippon Shokuhin Bunseki Center) - Ministério da Saúde, o eritritol é um adoçante não calórico e em relação aos demais açúcares-álcool, o eritritol têm baixa ação laxante e produção de gases intestinais (citado por ODA et alii, 1991).

OKU et alii (1988) estudaram o efeito fisiológico do eritritol em ratos e verificaram que a maior parte do eritritol é rapidamente absorvida pela mucosa do intestino delgado e, sem ser metabolizado, é excretado pela urina; o eritritol que não foi absorvido pela mucosa intestinal, segue para o intestino grosso onde parte do eritritol é fermentado pelas bactérias intestinais.

Em 1981, TAMBA et alii (citado por SASAKI et alii, 1988) examinaram a ação laxante de vários açúcares-álcool utilizando camundongos e verificaram que o sorbitol teve efeito laxante quando a dose administrada foi igual ou superior a 1500 mg/kg de peso corpóreo; com manitol e maltitol, o efeito laxante foi observado quando a dose administrada foi igual ou superior a 1000 mg/kg de peso corpóreo; com eritritol, o efeito laxante foi observado somente em doses iguais ou superiores a 2000 mg/kg de peso corpóreo. Com voluntários humanos não foi observado efeito laxante após ingestão de quantidades de 10 e 20 g de eritritol; contudo em ensaio envolvendo seis pessoas, duas delas apresentaram diarreia após ingestão de 50 g de eritritol.

OKU (citado por ODA et alii, 1993) realizou experimentos em que cinco voluntários ingeriram quantidades de 10 g e de 20 g de eritritol; o autor verificou que após, respectivamente 24 e 48 horas, mais de 90% da quantidade ingerida tinha sido eliminada, intacta, pela urina.

ODA et alii (1993) acreditam que a baixa produção de gases intestinais deve-se ao fato de que mais de 90% do eritritol é absorvido pelo intestino delgado e portanto, a quantidade de eritritol que é fermentado no intestino grosso, responsável pela formação de gases, é reduzida.

#### b. Não cariogênico

Em 1988, HIRASAWA et alii (citado por ODA et alii, 1989) verificaram que o eritritol não era utilizado por *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* e outros microrganismos presentes na cavidade bucal e que não eram produzidos polissacarídeos insolúveis como glucanas e nem ácidos.

### 2.1.3- Considerações sobre aplicações práticas do eritritol em tecnologia de alimentos

#### a. Adoçante de mesa

Na forma de cristais, o eritritol é um pó branco que devido às suas características de baixa higroscopicidade e boa dispersibilidade pode ser consumido como adoçante de mesa. Pode ser utilizado também em combinação com outros adoçantes, aumentando o poder edulcorante ou ainda, amenizando e/ou compensando os pontos falhos de outros adoçantes alternativos de modo a obter uma composição de qualidade mais próxima possível ao da sacarose e ao mesmo tempo, não cariogênico e de baixo valor calórico. (ODA et alii, 1993)

#### b. Chocolate

O eritritol pode ser empregado da mesma maneira que o açúcar granulado; o uso conjunto com outros adoçantes possibilita a produção de chocolates de textura, sabor e palatabilidade não inferiores aos produtos existentes no mercado além de acrescentarem outras qualidades como a redução calórica, efeito refrescante devido à natureza endotérmica do seu calor de dissolução e não cariogênico. (ODA et alii, 1993)

#### c. Gomas de mascar

A produção da goma de mascar baseia-se na formação de uma liga entre os minúsculos cristais de açúcar e a goma-base.

De acordo com ODA et alii (1993), graças à facilidade de se obter minúsculos cristais de eritritol e à sua baixa higroscopicidade, ele pode ser empregado na produção de gomas de mascar em substituição ao açúcar tradicional ou outro adoçante utilizado em sua formulação, resultando num produto de baixíssimas calorias e não cariogênico.

#### d. Balas

Nas formulações de balas duras, a completa substituição da sacarose por eritritol não é adequada pois resulta num produto quebradiço devido ao elevado grau de cristalização; porém, esses problemas podem ser superados com a utilização do eritritol associado com outros adoçantes tais como maltitol, maltooligosilacarose, palatinose, sem trazer prejuízos às características especiais que o eritritol confere aos produtos. (ODA et alii, 1993)

#### e. Iogurtes líquidos

De acordo com ODA et alii (1993), a adição de eritritol em leite fermentado após a etapa de fermentação láctica, em concentrações de cerca de 10%, evita o aumento excessivo da acidez durante o período de vida útil do produto permitindo aumentar o prazo de aceitação do produto sem prejudicar a intensidade da doçura e a qualidade;

para se obter o mesmo efeito com a sacarose, seria necessário adicionar 20% ou mais de sacarose, o que elevaria muito a doçura, prejudicando o sabor do produto.

#### f. Sorvete

A utilização de eritritol em formulações de sorvete requer o auxílio de um segundo adoçante para evitar a formação de um produto demasiadamente duro. (ODA et alii, 1993)

#### g. Suco em pó

O emprego de eritritol em formulações de suco em pó, devido às características endotérmicas do seu calor de dissolução, dispensa a adição de gelo para a preparação de suco gelado. De acordo com ODA et alii (1993), a dissolução de 10 g de eritritol em 90 g de água, reduz a temperatura da solução em cerca de 4,8°C ou ainda, a adição de 17 g de eritritol em 100 ml de água à temperatura de 22°C, reduz a temperatura da solução em cerca de 6°C.

#### h. Cobertura de produtos

O eritritol pode ser aplicado sobre a superfície dos alimentos atuando como um filme protetor devido ao baixo ponto de fusão e higroscopicidade.

Segundo ODA et alii (1993), biscoitos "sembei" recobertos com uma camada de solução de eritritol fundido, quando mantidos em ambientes com umidade relativa de 80%, temperatura de 30°C por 5 dias, absorveram apenas 5% de umidade enquanto que os biscoitos não tratados absorveram, sob mesmas condições, 18% de umidade.

## 2.2- MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO ERITRITOL

A obtenção do eritritol a partir da extração direta de suas fontes naturais é impraticável e inviável economicamente devido às quantidades extremamente reduzidas

na qual ele ocorre. Sua síntese pode ser realizada via transformação química ou microbiana.

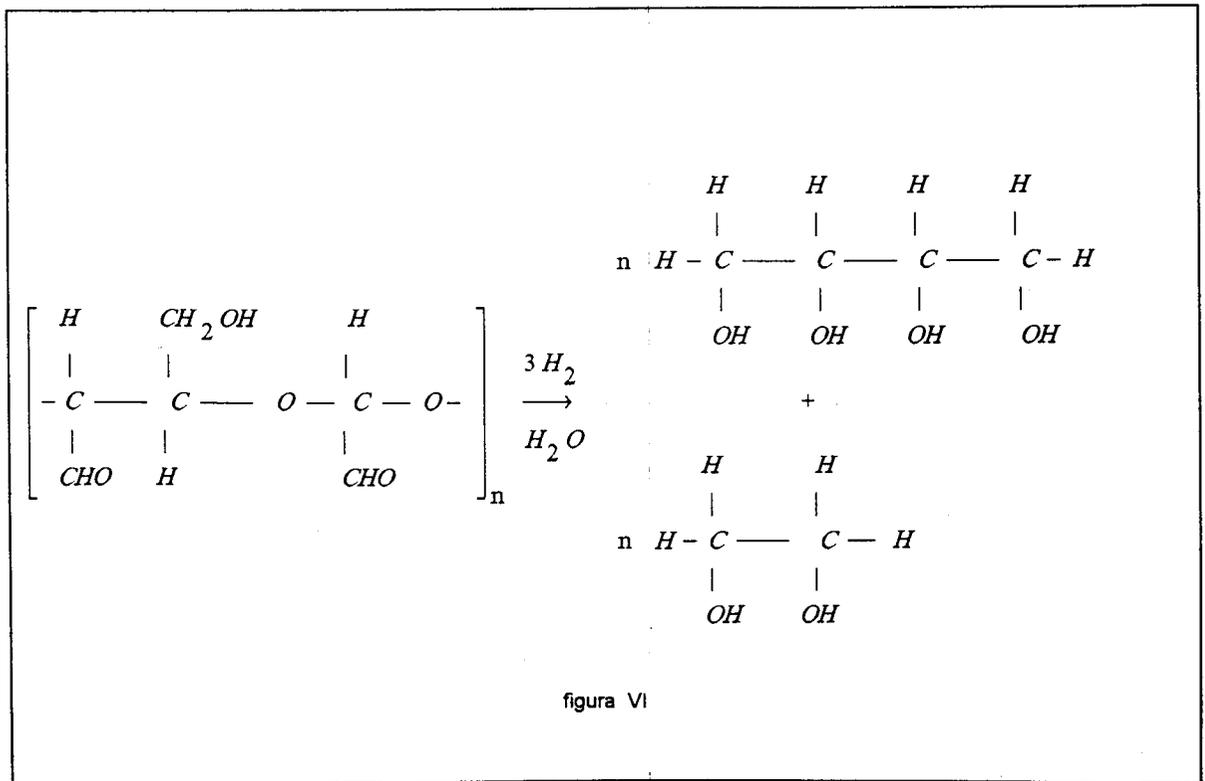
### 2.2.1- Síntese química (OTEY et alii, 1961)

#### a. Obtenção da matéria-prima

A matéria-prima básica para síntese química do eritritol é o polímero dialdeído de amido produzido pela oxidação do amido com ácido periódico; o dialdeído de amido consiste de resíduos alternados de eritrose e glicoxal.

#### b. Hidrogenação e hidrólise

A reação de síntese química do eritritol (figura VI) ocorre pela hidrogenação do grupo aldeído de uma solução de dialdeído de amido em condições de pressão (cerca de 2000 psi) e temperatura (aproximadamente 200°C) elevadas seguida pela hidrólise dos polímeros de triol produzidos à eritritol e aldeído glicólico; concomitantemente, este último é reduzido a etileno glicol.



### c. Obtenção dos cristais

A solução resultante da reação química, após a etapa de evaporação à vácuo, é resfriada para que ocorra a formação dos cristais de eritritol.

#### 2.2.2- Síntese microbiana do eritritol

De acordo com VEIGA-DA-CUNHA et alii (1992), a produção de eritritol e/ou glicerol por microrganismos está normalmente associada com fungos ou leveduras. Estes microrganismos eucarióticos são descritos como acumuladores de polióis ou de seus derivados em resposta ao aumento da pressão osmótica externa. Portanto, considera-se a existência destes açúcares-álcool solúveis de baixo peso molecular, como uma maneira dos microrganismos osmotolerantes eliminar a pressão do soluto e encontrar um ajuste intracelular através do acúmulo seletivo de solutos mais compatíveis com as enzimas celulares.

BINKLEY e WOLFROM (1950) foram os primeiros a sugerir que eritritol podia ser produzido por leveduras; eles detectaram traços de eritritol em resíduo de melado cubano fermentado.

SPENCER e SALLANS (1956) e SPENCER et alii (1957) isolaram a partir de flores, mel fermentado e frutas secas, leveduras tolerantes a alta concentração de açúcar classificadas principalmente como linhagens de *Saccharomyces rouxii* e *Torulopsis magnoliae*; esta última produzia glicerol e eritritol.

Os estudos detalhados para obtenção de eritritol via transformação microbiana tiveram início com HAJNY et alii em 1964. Os autores isolaram, a partir de pólen fresco, a linhagem I<sub>2</sub>A identificada como pertencente ao gênero *Torula* que posteriormente foi reclassificada como *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*. Utilizando glicose como fonte de carbono, a conversão em eritritol foi de 35 a 40%.

HASKINS e SPENCER isolaram, em 1967, a partir de colméias, a linhagem identificada como *Trichosporonoides oedocephalis* que, segundo SPENCER e SPENCER (1978), apresentou um bom rendimento de eritritol.

Em 1970, ONISHI e SUZUKI (citado por SPENCER & SPENCER, 1978) relataram a formação de eritritol a partir de glicose ou glicerol pela levedura *Trigonopsis variabilis*.

HATTORI e SUZUKI (1974a) no estudo da fermentação de n-alcanos por *Candida zeylanoides* para produção de ácido cítrico, observaram a produção de uma quantidade considerável de eritritol quando o pH do meio de cultura atingia valores inferiores à pH 4,0. A maior taxa de conversão em eritritol obtida, em relação ao n-alcano utilizado, em condições ótimas de fermentação, foi de 55%.

WAKO et alii (1988a) testaram cerca de 1700 linhagens de leveduras tolerantes à elevadas concentrações de glicose. Dentre estas, a linhagem T-115 identificada como *Aureobasidium sp* produziu, em relação à glicose consumida, cerca de 44,2% de eritritol e pequena quantidade de glicerol (5,3%), em meio contendo 20% de glicose e 0,5% de extrato de levedura ajustado a pH 7,0.

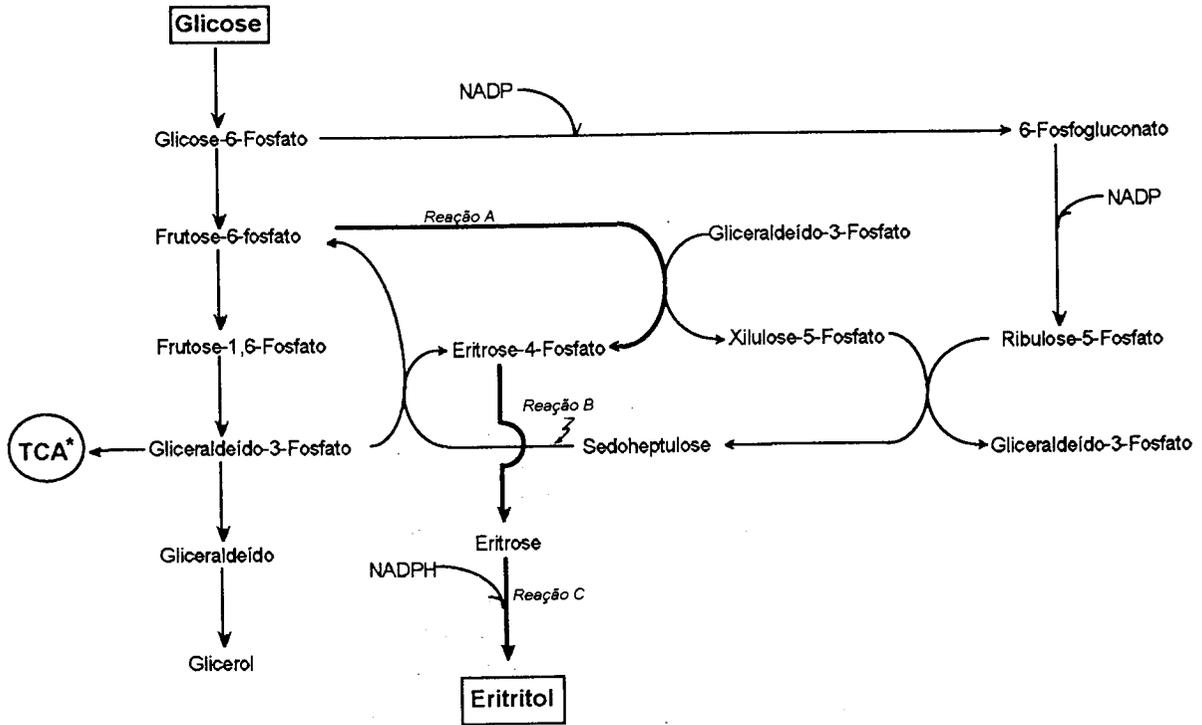
Dando continuidade aos estudos, WAKO et alii (1988b) isolaram uma linhagem mutante de *Aureobasidium sp* e obtiveram conversão máxima de glicose em eritritol de 51%, em meio contendo 20% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 0,05% de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, incubados a temperatura de 30°C durante 6 dias; verificaram também que a adição de 0,025% de AlCl<sub>3</sub> (6H<sub>2</sub>O) reprimiu completamente a formação de glicerol.

### 2.3- BIOSÍNTESE DE ERITRITOL

A biossíntese de polióis em leveduras osmotolerantes, de acordo com SPENCER e SPENCER (1978), envolve reações das vias de Embden-Meyerhof e Pentoses-Fosfato e outras reações alternativas.

Provavelmente, o eritritol é formado, principalmente, pela ação da enzima transcetolase sobre a frutose-6-fosfato (figura VII, reação A), transferindo 2 unidades de carbono para uma variedade de aceptores (por exemplo, gliceraldeído-3-fosfato) deixando um fragmento de 4 carbonos, a eritrose-4-fosfato, que é provavelmente defosforilado e reduzido; as demais reações da via Pentoses-Fosfato que catalisam a reação de síntese de eritritol (por exemplo, a reação de formação de eritrose-4-fosfato a

partir de sedoheptulose-7-fosfato) também ocorrem, porém são pouco expressivas (figura VII, reação B). (SPENCER & SPENCER, 1978)



\*Ciclo do Ácido Tricarboxílico

Figura VII

A enzima chave na síntese de eritritol é a eritrose redutase que catalisa a última etapa da transformação (figura VII, reação C) após defosforilação de eritrose-4-fosfato, um intermediário do ciclo das Pentoses-Fosfato, à eritrose, catalisada por uma fosfatase. (SASAKI, 1989; ISHIZUKA et alii, 1992)

De acordo como SPENCER e SPENCER (1978), não se tem conhecimento das vias metabólicas envolvidas na formação de álcoois poliídricos obtidas a partir de hidrocarbonos porém, baseando-se no conhecidos mecanismos de catabolismo de hidrocarbonos, acredita-se que, possivelmente, ambos ou um dos carbonos terminal do n-alcano podem ser oxidados à ácido carboxílico correspondente e então, através da  $\beta$ -oxidação, gerar 2 unidades de carbono que podem ser introduzidos na via metabólica do microrganismo para crescimento ou produção de outros metabólitos; no caso do eritritol

ou manitol, acreditam que estes podem ser sintetizados por exemplo, pela condensação de 2 ou 3 unidades de acetil-CoA.

## 2.4- PROCESSO DE PRODUÇÃO MICROBIANA DE ERITRITOL

### 2.4.1- Condições de cultura

Em leveduras osmotolerantes, em condições de baixa atividade de água, acredita-se que a produção de polióis durante o crescimento tem como função essencial prevenir a inibição ou inativação de enzimas. Os rendimentos dos diferentes álcoois poliídricos podem, no entanto, ser influenciados pelas condições de crescimento e produção. Dentre estes parâmetros, a composição do meio, principalmente a escolha das fontes de carbono e nitrogênio, o nível de aeração e a temperatura são os que têm maior influência no rendimento e na taxa de fermentação. (SPENCER & SPENCER, 1978)

#### 2.4.1.1- Composição do meio de cultura

##### 2.4.1.1.1- Fontes de carbono

###### a- Carboidratos

HAJNY et alii (1964) estudaram o comportamento da linhagem I2A produtora de eritritol, em meios contendo 1% de extrato de levedura e 5% de fonte de carbono proveniente de carboidratos diferentes; verificaram que a levedura não apresentou crescimento em meios de cultura contendo inositol, xilitol, galactose, xilose, arabinose e lactose; apresentou bom crescimento porém sem produção de eritritol, nos substratos manitol, glicerol e eritritol; e, em meios contendo glicose, frutose, manose, maltose e sacarose, o microrganismo apresentou bom crescimento e produção de eritritol.

HASKINS e SPENCER (1967) reportaram que *Trichosporonoides oedocephalis* fermenta e assimila glicose, galactose, maltose e sacarose.

Em 1970, ONISHI e SUZUKI reportaram que as fontes de carbono mais adequadas para produção de eritritol por *Trigonopsis variabilis* foram glicerol e glicose.

WAKO et alii (1988b) no estudo das fontes de carbono assimilados por mutante de *Aureobasidium sp.*, obtiveram resultados similares àqueles obtidos por HAJNY et alii (1964). Em meio de cultura contendo 10% de fonte de carbono e 0,5% de extrato de levedura, pH 8,0, a levedura utilizou, além da glicose do meio de cultura padrão, a sacarose e a frutose com produção de quantidades relativamente elevadas de eritritol; manose e maltose foram utilizadas, porém com menor produção de eritritol. O microrganismo não cresceu em meios contendo galactose, lactose, xilose, arabinose, sorbitol e manitol.

#### b- Hidrocarbonos

HATTORI e SUZUKI (1974a) relataram a produção de eritritol por linhagem mutante de *Candida zeylanoides* em meios contendo diferentes frações de n-alcano e outras fontes de carbono. Os pesquisadores verificaram que n-alcenos, particularmente as frações C-14, C-15 e C-16 foram as fontes de carbono mais adequadas para produção de eritritol. Os compostos manitol, glicerol e óleo de milho foram relativamente bem assimilados enquanto que o microrganismo apresentou baixo crescimento e produção de eritritol em meios de cultura contendo etanol, ácido acético, sorbose e rafinose como fonte de carbono. A linhagem de *Candida zeylanoides* apresentou bom crescimento em meios contendo glicose, frutose e sacarose porém não produziu eritritol.

#### 2.4.1.1.2- Fontes de nitrogênio

Segundo SPENCER e SPENCER (1978), a maioria das leveduras que são normalmente usadas na produção de álcoois poliídricos utilizam somente sais de amônia como fonte de nitrogênio; *Torulopsis magnoliae* (VAN UDEN & VIDAL-LEIRIA, 1970) e *Trichosporonoides oedocephalis* (HASKINS & SPENCER, 1967) são as únicas que podem assimilar nitrato como fonte de nitrogênio inorgânico. Muitas leveduras no entanto, podem usar uma variedade de aminoácidos e outros compostos orgânicos nitrogenados; fontes complexas de nitrogênio são empregadas, geralmente, em meios para produção de álcoois poliídricos. Extrato de levedura e extrato de milho são fontes

de nitrogênio satisfatórias e fornecem também uma quantidade adequada de fatores de crescimento.

HAJNY et alii (1964) estudaram a influência das diferentes concentrações de extrato de levedura e uréia no meio de cultura para produção de eritritol pela linhagem I<sub>2</sub>A. Os autores constataram que concentrações elevadas de extrato de levedura (2%) promoviam o aumento excessivo da massa celular e baixo rendimento de eritritol; em contrapartida, concentrações baixas de extrato de levedura (0,25-0,5%) forneciam bom rendimento de eritritol mas a utilização de açúcares era muito lenta devido à baixa concentração celular. Com relação ao efeito da uréia no meio de cultura, os pesquisadores verificaram que ela estimula o crescimento celular. Dessa forma, concluíram que para obter bom rendimento de eritritol e crescimento celular adequado, o meio deve conter uréia (0,1%) e baixas concentrações de extrato de levedura (0,5%). Os pesquisadores testaram também a fermentação da linhagem I<sub>2</sub>A em 5 fontes naturais de nutrientes: extrato de milho, melaço de cana, malte germinado, malte e extrato solúvel de mosto obtido de destilarias; todos forneceram bons rendimentos de eritritol, porém, para estudos posteriores, os pesquisadores escolheram extrato de milho pois em baixas concentrações, o rendimento de eritritol foi bom e a fermentação foi aparentemente mais rápida do que nas demais fontes.

HATTORI e SUZUKI (1974b), no estudo da produção de polióis por linhagem mutante de *Candida zeylanoides* a partir de n-alcanos, constataram que a substituição do sulfato de amônio por extrato de levedura, extrato de carne, extrato de milho ou polipeptona promove um crescimento celular vigoroso com aumento da produção de manitol e redução de eritritol.

WAKO et alii (1988b), no estudo das condições de cultura para produção de eritritol por linhagem mutante de *Aureobasidium* sp, examinaram o efeito de diversas fontes de nitrogênio no rendimento de eritritol; verificaram que em relação ao meio controle (20% de glicose e 0,5% de extrato de levedura), a taxa de conversão de glicose em eritritol foi maior nos meios contendo peptona e casaminoácido; além disso, a redução do glicerol, em relação ao meio controle, foi superior à 50%. Os autores constataram também que o emprego de casaminoácido livre de vitaminas foi responsável pela ligeira redução no crescimento celular e conseqüente aumento da concentração de glicose residual. Os pesquisadores estudaram também os efeitos da complementação do meio de cultura contendo apenas extrato de levedura com

diferentes aminoácidos. Em meio contendo 20% de glicose, 0,3% de extrato de levedura e 0,1 a 0,2% de aminoácido, constataram taxas elevadas e estáveis de conversão de glicose em eritritol porém, em todos os meios, com exceção daquele contendo metionina, o rendimento de glicerol foi menor, destacando-se o meio contendo glutamato de sódio que, mesmo em baixíssimas concentrações (0,1%), reprimiu completamente a produção de glicerol.

#### 2.4.1.1.3- Cloreto de sódio e potássio

Para a produção de polióis, a presença destes sais são importantes principalmente, devido ao seu efeito sobre a pressão osmótica do meio. No entanto, o efeito de elevadas concentrações de sais é, algumas vezes, prejudicial à produção de polióis. (SPENCER & SPENCER, 1978)

Em 1964, HAJNY et alii observaram que quando a concentração de cloreto de potássio foi aumentada de 0 a 3M, a utilização de glicose diminuiu sensivelmente, acompanhado pela queda no rendimento de eritritol e, o glicerol que não foi produzido no meio de cultura livre de cloreto de potássio, aumentou gradualmente.

HATTORI e SUZUKI (1974a) estudaram o efeito da concentração do cloreto de sódio e potássio por linhagem mutante de *Candida zeylanoides* na produção de eritritol a partir de n-alcenos; constataram que concentrações de 0 a 0,5% de cloreto de sódio ou potássio não tinham efeito na produção de eritritol; porém, em concentrações superiores (1 a 3%) observaram um marcado aumento na produção de eritritol acompanhado de manitol.

#### 2.4.1.1.4- Vitaminas, fosfato e outros sais inorgânicos

HAJNY et alii (1964) estudaram o efeito do fosfato inorgânico na produção de eritritol pela levedura I2A e concluíram que a presença de fosfato em concentrações maiores que as necessárias para o crescimento, reflete negativamente no rendimento de eritritol. Quanto aos requerimentos vitamínicos, constataram que a tiamina é uma vitamina essencial para o crescimento celular bem como para assimilação do açúcar e produção de eritritol.

HATTORI e SUZUKI (1974b) observaram que elevadas concentrações de fostato estimulam o crescimento celular da linhagem mutante de *Candida zeylanoides* e favorecem a produção de manitol porém, reprimem consideravelmente a produção de eritritol.

WAKO et alii (1988b) constataram que a adição de 0,5% de sulfato de sódio no meio de cultura padrão aumenta sensivelmente o rendimento de eritritol e glicerol pela linhagem de *Aureobasidium* sp e sugeriram que o sulfato de sódio estimula a produção de polióis. O cloreto de alumínio hexaidratado teve pouco efeito no rendimento de eritritol porém, reprimiu completamente a produção de glicerol quando em concentrações de 0,025 - 0,075%.

#### 2.4.1.2- Aeração

HAJNY et alii (1964) examinaram o efeito da aeração na produção de eritritol pela linhagem I<sub>2</sub>A e concluíram que a taxa de fornecimento de oxigênio por unidade de biomassa é um fator crítico que determina a porcentagem de conversão de glicose em eritritol.

HATTORI e SUZUKI (1974a), estudaram o efeito da aeração na produção de eritritol pela linhagem mutante de *Candida zeylanoides* a partir de n-alcenos, variando o volume do meio; a produção mais eficiente foi obtida quando os frascos de Erlenmeyer de 300 ml continham um volume de 30 a 50 ml de meio.

WAKO et alii (1988b), no estudo da influência do volume do meio de cultura na produção de eritritol pelo mutante de *Aureobasidium* sp, observaram que volumes de meio de cultura de 25 a 150 ml contidos em frascos de Erlenmeyer de 500 ml forneceram bons rendimentos de eritritol e, estes foram ligeiramente crescentes quanto menor o volume do meio de cultura; quanto à produção de glicerol, entre 25 e 100 ml de meio de cultura, apresentou um comportamento semelhante ao de eritritol.

#### 2.4.1.3- Temperatura

No estudo do efeito da temperatura na produção de eritritol pela levedura I<sub>2</sub>A, HAJNY et alii (1964), constataram maior produção de eritritol e utilização mais rápida do

substrato quando a fermentação foi realizada a temperatura de 30°C. Na fermentação a 35°C o rendimento de eritritol foi menor com produção de quantidades substanciais de glicerol.

HATTORI e SUZUKI (1974a) reportaram que a temperatura ótima para fermentação do meio para produção de eritritol por *Candida zeylanoides* a partir de n-alcanos foi de 30°C; em temperaturas superiores, observaram redução marcante na produtividade de eritritol.

WAKO et alii (1988b) estudaram o efeito da temperatura de fermentação na produção de eritritol pela linhagem mutante de *Aureobasidium sp* a partir do substrato glicose e concluíram que a temperatura ótima para maior rendimento de eritritol e menor produção de glicerol foi 34-35°C.

#### 2.4.1.4- pH

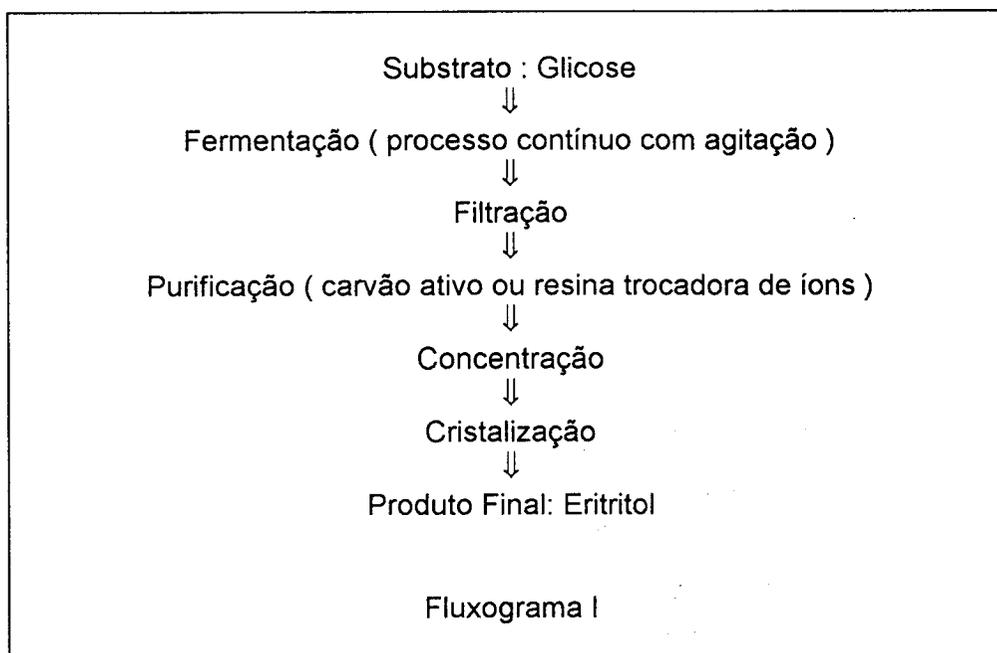
HATTORI e SUZUKI (1974a), no estudo da fermentação do meio de cultura contendo n-alcanos pela linhagem mutante de *Candida zeylanoides*, constataram que o controle do pH do meio era fundamental para a produção de eritritol; em contraste com os resultados obtidos nos estudos de produção de polióis a partir de glicose, a produção de eritritol a partir de n-alcanos foi observada somente numa estreita faixa de pH 2,5 a 4,5.

No estudo do efeito do pH inicial do meio de fermentação na produção de eritritol por mutante de *Aureobasidium sp*, WAKO et alii (1988b), concluíram que o pH ótimo estava entre 5 e 6 embora a produção de glicerol tenha sido elevada também.

#### 2.4.2- Produção de eritritol em larga escala

Em 1988, SASAKI et alii estudou o processo de fermentação contínua para produção de eritritol em larga escala pela linhagem mutante de *Aureobasidium sp* utilizando solução de glicose à 40% como matéria-prima; obtiveram por mês, ininterruptamente, 5,1 g de eritritol/l.h à uma taxa de 50% de conversão de glicose em eritritol.

Segundo ODA et alii (1993), a produção industrial de eritritol via transformação microbiana, como indicado no fluxograma I, é constituído basicamente de 5 etapas.



### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- MATERIAL

##### 3.1.1- Reagentes e materiais específicos

-Reagentes químicos: ácidos, bases e solventes.

-Reagentes específicos: ácido sulfanílico, sal de DBB ("o-dianisidine tetrazotized"-marca SIGMA) e  $\alpha$ -naftilamina.

-Carboidratos e polióis: sacarose, glicose, frutose, glicerol (ECIBRA) e meso-eritritol (Nacalai Tesque).

-Meios de cultura: ágar, extrato de malte, extrato de levedura, peptona, "corn meal agar" (DIFCO), "yeast carbon base" (DIFCO), "yeast nitrogen base" (DIFCO).

-Papel de cromatografia e filtros: papel Whatman Nº1 de 46x57 cm; filtros Millipore HA, 45µm.

### 3.1.2- Equipamentos

- Agitador Rotatório New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.

- Espectrofotômetro Coleman 124D.

- Centrífuga Refrigerada Beckman modelo J-21B.

- Cromatógrafo Líquido Waters modelo 600 E, coluna YMC-Pack Polyamine-II com refratômetro diferencial e integrador Waters 410.

- Estufas Bacteriológicas FANEM.

## 3.2- MÉTODOS

### 3.2.1- Isolamento e seleção de microrganismos produtores de eritritol

Com o objetivo de selecionar microrganismos produtores de eritritol foram isolados a partir de flores, mel, colméias e favos, microrganismos osmofílicos, e testados conforme os métodos descritos a seguir.

#### 3.2.1.1- Coleta de amostras

As amostras foram coletadas em tubos contendo 2 ml de meio líquido para seleção de microrganismos osmofílicos (HAJNY et alii, 1964) modificado constituído de 40% de sacarose e 1% de extrato de levedura, pH 6,2-6,4, previamente esterilizados ou acondicionadas em sacos plásticos e utilizadas o mais rápido possível.

### 3.2.1.2- Seleção e isolamento de microrganismos osmofílicos

Cerca de 1 g de material coletado foi inoculado em frasco de Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml do meio líquido utilizado para seleção de microrganismos (descrito no item 3.2.1.1) previamente esterilizado e incubado em agitador rotatório a 200rpm por 72 horas a 30°C. Após incubação, uma alçada do meio incubado foi diluído em 20 ml de água destilada estéril e inoculado, segundo a técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo o seguinte meio para isolamento (HAJNY et alii, 1964) modificado, previamente esterilizado: sacarose (20%), extrato de levedura (1%) e ágar (2%), pH 6,2-6,4. A placa foi incubada em estufa a 30°C por 24 a 72 horas para o desenvolvimento das leveduras. As colônias isoladas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o seguinte meio inclinado (HAJNY et alii, 1964) modificado, previamente esterilizado: sacarose (20%), extrato de levedura (1%), uréia (0,1%) e ágar (2%), e incubados a 30°C durante 24 a 48 horas.

### 3.2.1.3- Seleção preliminar de microrganismos produtores de eritritol

As leveduras isoladas de acordo com o item 3.2.1.2 foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 50 ml, contendo 20 ml do seguinte meio de cultura I para produção de eritritol (HAJNY et alii, 1964) modificado, previamente esterilizado: sacarose (10%), extrato de levedura (0,5%) e uréia (0,1%), pH 6,2-6,4. Os frascos foram incubados em agitador rotatório durante 72 horas a 30°C. O meio incubado foi centrifugado a 11000 g durante 15 minutos a 5°C e a produção de eritritol foi testada no sobrenadante como descrito a seguir.

### 3.2.1.4- Cromatografia descendente de açúcares em papel

A cromatografia descendente de açúcares em papel foi realizada em papel Whatman Nº1. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia descendente em papel foi acetato de etila:2-propanol:água destilada na proporção 6:3:1 (v/v), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 15 horas para um comprimento de papel de 46 cm. Os padrões utilizados foram glicose, frutose, sacarose, glicerol e eritritol. Os açúcares e polióis foram revelados com AgNO<sub>3</sub> em acetona e NaOH alcoólico de acordo com o método descrito por Trevelyan et alii (1950).

### 3.2.1.5- Seleção preliminar dos microrganismos produtores de níveis elevados de eritritol

Os microrganismos selecionados no item anterior foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 50 ml, contendo 20 ml do meio de cultura I para produção de eritritol descrito no item 3.2.1.3. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm durante 120 horas a 30°C. O meio fermentado foi centrifugado a 11000 g, durante 15 minutos a 5°C; com o sobrenadante, procedeu-se a seleção preliminar de microrganismos produtores de níveis elevados de eritritol através da cromatografia descendente de açúcares em papel, descrito no item 3.2.1.4, por comparação do tamanho e intensidade das manchas correspondentes a eritritol.

### 3.2.1.6- Seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol

Para seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol foi estudada a relação entre tempo de fermentação e produção de eritritol dos microrganismos selecionados no item anterior, em dois diferentes meios de cultura. Os microrganismos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml do meio de cultura I estéril para produção de eritritol descrito no item 3.2.1.3 e, paralelamente, procedeu-se o mesmo ensaio utilizando o meio de cultura II para produção de eritritol (HAJNY et alii, 1964) constituído de glicose (10%), extrato de levedura (0,5%) e uréia (0,1%) estéril. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 200 rpm, a 30°C, nos seguintes tempos de fermentação: 24, 72, 120 e 144 horas. O meio fermentado foi centrifugado à 11000 g durante 15 minutos a 5°C. A concentração de eritritol nos sobrenadantes dos meios de cultura foram determinados de acordo com o método descrito no item 3.2.1.7. Para determinação do crescimento celular, a massa celular foi lavada com 20 ml de água destilada e centrifugada sob as mesmas condições anteriores por 3 vezes, secada em estufa a 70°C e pesada em balança analítica.

### 3.2.1.7- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O sobrenadante contendo os carboidratos e polióis obtido de acordo com o item 3.2.1.6, previamente filtrado em filtros Millipore 0,45 µm, foi analisado através da cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizada a coluna de YMC-Pack-Polyamine II, temperatura da coluna de 30°C e fase móvel composta de etanol, acetato de etila,

acetonitrila e água destilada e filtrada nas proporções 30:30:25:15 (v/v) respectivamente, com fluxo de 0,8 ml/min.

### 3.2.2- Identificação da linhagem produtora de eritritol selecionada

O microrganismo melhor produtor de eritritol foi identificado de acordo com as chaves de classificação de KREGGER-VAN RIJ (1984) e estudos de HASKINS & SPENCER (1967). A classificação foi baseada nas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de reprodução.

#### 3.2.2.1- Características das células vegetativas

##### 3.2.2.1.1- Morfologia das células vegetativas

Para o estudo das características morfológicas em meio sólido a levedura em estudo foi inoculada em placa de Petri contendo o meio ágar YM ("yeast malt agar") estéril, preparado conforme anexo 1. Pelo exame microscópico foi observado a forma e o modo de reprodução da levedura. As características da colônia em meio sólido (textura, cor, características da superfície, elevação e aspecto das margens) foram observadas a olho nú.

##### 3.2.2.1.2- Formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, conidiosporos, blastosporos e artrosporos

Para este propósito, utilizou-se a técnica de Dalmau (WICKERHAM, citado por KREGGER-VAN RIJ, 1984). Cultura jovem da linhagem em estudo foi inoculada na forma de estria e em 2 pontos da superfície da placa de Petri contendo o meio ágar CMA ("corn meal agar") preparado conforme anexo 2; em uma das extremidades da estria e num dos pontos de inoculação, foram colocados uma lamínula estéril como indicado na figura VIII. A formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, conidiosporos, blastosporos e

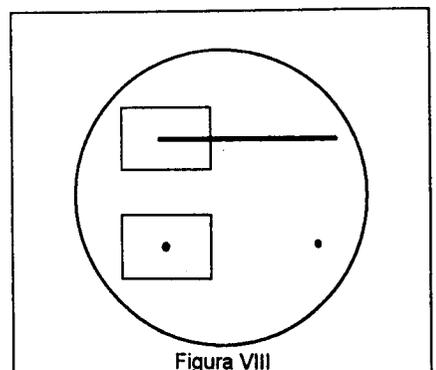


Figura VIII

artrosporos foram verificadas microscopicamente em aumento de 125 vezes após 7 a 10 dias de incubação a 25°C.

### 3.2.2.2- Formação de asco e ascosporos

A cultura jovem da linhagem em estudo previamente desenvolvida em meio ágar YM por 48 horas a 30°C foi inoculada na superfície inclinada dos meios ágar acetato de Fowell (FOWELL, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984), ágar acetato de McClary (McCLARY et alii, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984) e ágar YA ("yeast autolyzate agar") preparados em tubos de ensaio conforme anexos 3, 4 e 5 respectivamente, e incubados durante 3 dias a 4 semanas a 25°C. A formação de ascos e ascosporos foi verificada microscopicamente suspendendo a levedura em solução de azul de metileno sobre a lâmina de vidro e também por coloração de esporos como descrito no anexo 6.

### 3.2.2.3- Características fisiológicas e bioquímicas

#### 3.2.2.3.1- Utilização de compostos de carbono

##### 3.2.2.3.1.1- Fermentação de carboidratos (WICKERHAM, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984)

Para o estudo da fermentação de carboidratos, a levedura foi cultivada previamente em 10 ml de meio YM por 8 horas a 25°C; a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada estéril e ressuspensa em 10 ml de água estéril. Alíquotas de 100 µl da suspensão de leveduras foi adicionada assepticamente nos tubos contendo glicose, galactose, celobiose, rafinose, sacarose e maltose preparados conforme anexo 7 e incubados a 25°C por um período superior a 14 dias observando-se regularmente o acúmulo de gás nos tubos de Durham.

3.2.2.3.1.2- Assimilação de compostos de carbono (WICKERHAM & BURTON, WIKERHAM, LODDER & KREGER VAN RIJ, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984)

A linhagem foi inoculada em tubos contendo 10 ml de caldo YM e incubada por 48 horas a 25°C . Após a incubação, a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada estéril; uma alíquota de 100 µl de suspensão foi adicionada assepticamente aos tubos contendo 4,5 ml de uma solução de carboidrato estéril contendo 100 mg de fonte de carbono: sacarose , celobiose, lactose, galactose, maltose e xilose. A seguir, adicionou-se assepticamente 0,5 ml de YNB ("yeast nitrogen base") dez vezes reforçado, esterilizado por filtração; os tubos foram incubados durante 7 a 24 dias a 25°C.

3.2.2.3.2- Assimilação de compostos nitrogenados: nitrato de potássio (NICKERSON, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984)

Para verificar a assimilação de nitrato, a levedura foi previamente inoculada em meio ágar YM por 24 h e em seguida foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução de YCB ("yeast carbon base") preparado conforme anexo 8 e incubado a 25°C. Após 3, 5, 10 e 15 dias de incubação adicionou-se 3 a 5 gotas do reagente I e II preparados conforme anexo 8, em cada tubo de ensaio. A assimilação de nitrato é indicada pelo desenvolvimento de coloração rosada ou vermelha característica. No caso de teste negativo verificou-se o consumo de nitrito pela adição de zinco em pó no tubo de ensaio.

3.2.2.3.3- Teste de Diazonium Blue B (DBB) (van der WALT & HOPUSU-HAVU, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984)

A linhagem em estudo foi inoculada em placa contendo meio de cultura ágar GYP preparado conforme anexo 9, por 3 semanas a 30°C.

O reagente DBB foi preparado por dissolução de 15 mg de sal de DBB ("o-dianisidine tetrazotized") em 15 ml de tampão TRIS 0,25 M, pH 7,0 e mantido em banho de gelo.

Após a incubação da linhagem em meio GYP (preparado conforme anexo 9), foram aplicados 2 gotas do reagente DBB na superfície da colônia; a reação positiva é reconhecida quando as colônias desenvolvem uma coloração vermelha escura ou cor vermelho violeta após 1-2 minutos à temperatura ambiente.

#### 3.2.2.3.4- Teste da atividade de urease (CHRISTENSEN, citado por KREGER VAN-RIJ, 1984)

A linhagem em estudo foi inoculada em picada e na superfície do meio ágar uréia inclinado do tubo de ensaio preparado conforme anexo 10 e incubado a 25°C por 5 dias; a reação positiva é reconhecida quando as colônias desenvolvem uma coloração rosa choque.

#### 3.2.3- Conservação da linhagem produtora de eritritol selecionada

Para a manutenção da linhagem, o microrganismo foi cultivado em tubos de ensaio de 150x15 mm contendo 5 ml do seguinte meio de cultura inclinado (descrito no item 3.2.1.2) previamente esterilizado: 20% de sacarose, 1% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e 2% de ágar; após incubação por 48 horas a 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de ensaio. A cultura foi conservada à temperatura de 5°C com repicagem a cada 2 a 3 meses.

#### 3.2.4- Estudo da relação entre tempo de fermentação, temperatura de fermentação e produção de eritritol utilizando os substratos sacarose e glicose nos meios de cultura para produção de eritritol pela linhagem selecionada .

##### 3.2.4.1- Preparação do inóculo

A levedura selecionada foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio de cultura I constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia ajustado a pH 6,2 - 6,4 e em meio de cultura II constituído de 10% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia ajustado a pH 6,2 - 6,4,

previamente esterilizados. Os frascos foram incubados a 30°C, em agitador rotatório a 200 rpm durante 24 horas.

#### 3.2.4.2- Fermentação

Adicionou-se assepticamente 1 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.4.1, em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml do respectivo meio de cultura para produção de eritritol. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, nas seguintes temperaturas: 25°C, 30°C e 35°C e retirados após 48, 96, 120 e 144 horas de fermentação. O meio fermentado foi centrifugado a 11000 g durante 15 minutos a 5°C. A partir do sobrenadante foi verificada a produção de carboidratos e polióis de acordo com o item 3.2.1.7. Para determinação do crescimento celular, a massa celular foi lavada com 20 ml de água destilada e centrifugada sob as mesmas condições anteriores por 3 vezes, secada em estufa a 70°C e pesada em balança analítica.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

#### 4.1.1- Isolamento e seleção preliminar de microrganismos produtores de eritritol

Após o isolamento de 402 linhagens de leveduras osmofílicas, foram selecionadas preliminarmente, 22 linhagens de leveduras produtoras de eritritol de acordo com o método descrito no item 3.2.1.3.

#### 4.1.2- Seleção preliminar de microrganismos produtores de níveis elevados de eritritol

Entre as 22 linhagens de leveduras produtoras de eritritol foram selecionadas, através da cromatografia em papel descrita no item 3.2.1.3, as linhagens 150-5 e 331-1 que produziram quantidades relativamente elevadas de eritritol. As figuras 1 e 2 ilustram o perfil de utilização dos substratos glicose e sacarose e formação dos produtos pelas linhagens 150-5 e 331-1 respectivamente, durante a fermentação. Dentro do nível de sensibilidade do método não foi detectado glicerol ou qualquer outro álcool poliídrico no meio fermentado.

#### 4.1.3- Seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol

O estudo para seleção do microrganismo melhor produtor de eritritol foi realizado de acordo com o método descrito nos itens 3.2.1.6 e 3.2.1.7.

As figuras 3, 4, 5 e 6 ilustram o perfil de utilização dos substratos e a formação dos produtos, pelas linhagens 331-1/substrato sacarose, 331-1/substrato glicose, 150-5/substrato sacarose e 150-5/substrato glicose, respectivamente.

As figuras 7 e 8 obtidas por integração das áreas relativas dos cromatogramas (figuras 3, 4, 5 e 6) ilustram a produção de eritritol e glicerol durante a fermentação, pelas linhagens 331-1 e 150-5, a partir dos substratos sacarose e glicose; observou-se que em ambos os substratos glicose e sacarose, a produtividade foi maior com a linhagem 331-1. Além disso, constatou-se que, embora as 2 linhagens tenham produzido glicerol, a produtividade foi menor na linhagem 331-1 em ambos os

substratos. Com base nestes resultados, foi selecionada como a melhor produtora de eritritol, a linhagem 331-1.

#### 4.2- IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM MELHOR PRODUTORA DE ERITRITOL

A linhagem 331-1, melhor produtora de eritritol foi identificada como *Trichosporonoides sp* de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.2.

As características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de reprodução da linhagem *Trichosporonoides sp* estão ilustradas na tabela 1. A figura 9 ilustra colônias de *Trichosporonoides sp* em meio ágar YM após 120 horas de incubação.

HASKINS E SPENCER (1967) isolaram a partir de colméia, um microrganismo produtor de eritritol e classificaram-no como *Trichosporonoides oedocephalis* n. gen.; n. sp. Segundo os pesquisadores, este microrganismo apresentava características similares àqueles do gênero *Trichosporon* Behrend, porém produzia também conidiosporos; devido às características que o organismo possuía em comum com *Trichosporon*, sugeriram um novo gênero *Trichosporonoides*.

Segundo HOOG e MCGINNIS (1987), as leveduras do gênero *Trichosporonoides* descritas por HASKINS & SPENCER são também conhecidas como leveduras pretas pois depositam melanina na parede celular porém não se relacionam com os demais grupos de leveduras pretas conhecidas.

Segundo MOORE (1987), muitas evidências apresentadas por HOOG (1979) indicam que as leveduras pretas do gênero *Trichosporonoides* descritas por HASKINS & SPENCER são basidiomicetos com parede celular lamelar, DBB (+) e habilidade de hidrolisar uréia.

A classificação deste gênero é polêmico; HOOG (1979) sugere a associação do gênero *Trichosporonoides* descritas por HASKINS & SPENCER com *Cryptococcus* KÜTZING (citado por MOORE, 1987).

#### 4.3- ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ERITRITOL A PARTIR DOS SUBSTRATOS GLICOSE E SACAROSE POR *TRICHOSPORONOIDES SP.*

As figuras 10 e 11 ilustram a produtividade dos polióis eritritol e glicerol durante o curso da fermentação de *Trichosporonoides sp* em meios contendo glicose e sacarose respectivamente, nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C.

As tabelas 2 e 3 mostram os dados de crescimento celular, açúcar residual e produtividade de eritritol e glicerol no curso da fermentação a 25°C, 30°C e 35°C.

A produção de eritritol foi maior quando a fermentação foi realizada a 30°C e a 35°C tanto em meio contendo glicose como sacarose. A produção máxima de eritritol foi de cerca de 65 mg/ml em meio contendo glicose e 51 mg/ml em meio contendo sacarose, verificado após 5 a 6 dias de fermentação a 30°C ou 35°C.

A fermentação a 25°C favoreceu o crescimento celular e a produção de glicerol, provavelmente às custas de uma menor taxa de conversão do substrato em eritritol.

A concentração dos subprodutos frutose e glicerol após 5 a 6 dias de fermentação foram maiores a 25°C. A concentração de frutose após 5 a 6 dias de fermentação, foi de cerca de 1,8 mg/ml em meio glicose e 49 mg/ml em meio sacarose. A concentração de glicerol foi de 1,5 mg/ml em meio glicose e em quantidades traços em meio sacarose, após 5 a 6 dias de fermentação.

No estudo do efeito da temperatura na produção de eritritol pela levedura I2A, HAJNY et alii (1964) constataram maior produção de eritritol e utilização mais rápida do

substrato glicose quando a fermentação foi realizada a 30°C. Na fermentação a 35°C o rendimento de eritritol foi menor com produção de quantidades substanciais de glicerol.

WAKO et alii (1988b) estudaram o efeito da temperatura de fermentação na produção de eritritol pela linhagem mutante de *Aureobasidium sp* a partir do substrato glicose. Os autores concluíram que a temperatura ótima para maior rendimento de eritritol e menor produção de glicerol foi 34-35°C.

#### 4.4- ESTUDO COMPARATIVO DA CINÉTICA DE TRANSFORMAÇÃO DOS SUBSTRATOS GLICOSE E SACAROSE EM ERITRITOL

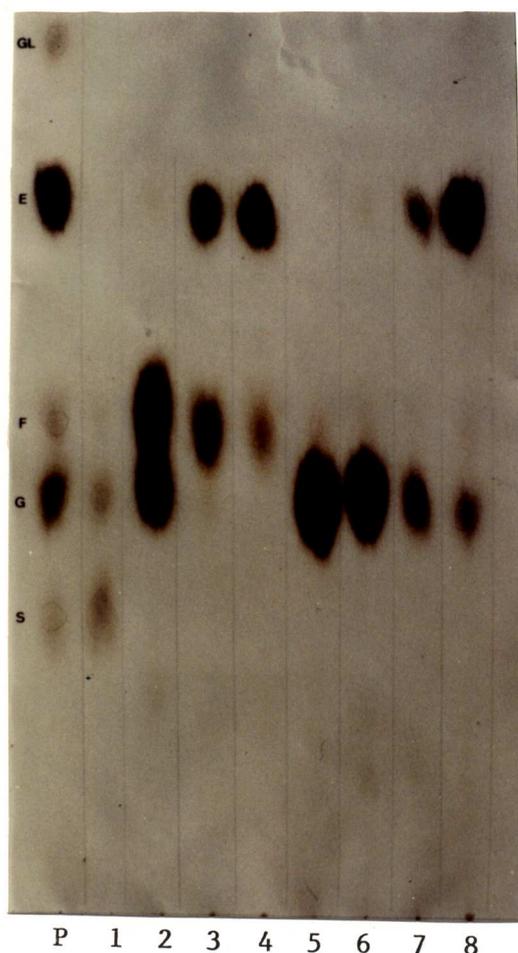
As figuras 12 e 13 representam o curso da fermentação por *Trichosporonoides sp* e seu crescimento celular, a partir dos substratos glicose e sacarose respectivamente, a 30°C.

No estudo da fermentação do substrato glicose por *Trichosporonoides sp* a 30°C, observou-se que esta foi rapidamente metabolizada, formando-se simultaneamente, eritritol, frutose e glicerol no meio de cultura. Após 5 a 6 dias de fermentação atingiu-se a conversão máxima glicose em eritritol de cerca de 65% e os subprodutos glicerol e frutose estavam presentes em quantidades traços de cerca de 0,1 mg/ml e 1,3 mg/ml respectivamente.

Quando a sacarose foi utilizada como substrato inicial por *Trichosporonoides sp* a 30°C, observou-se que esta foi completamente desdobrada a glicose e frutose. A glicose formada, sucessivamente, foi rapidamente metabolizada dando origem a frutose, eritritol e traços de glicerol. O perfil de formação do eritritol foi similar ao observado na fermentação do meio de cultura contendo glicose. A formação de frutose foi consideravelmente maior e a sua utilização foi mais lenta. Após 5 a 6 dias de fermentação, a conversão da sacarose em eritritol foi máxima (aproximadamente 51%) e a concentração de frutose residual foi de cerca de 38 mg/ml. Praticamente não se observou a formação de glicerol durante o curso da fermentação.

## FIGURAS

FIGURA 1 - Cromatografia em papel ilustrando o perfil de utilização dos substratos glicose e sacarose e formação dos produtos pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C.

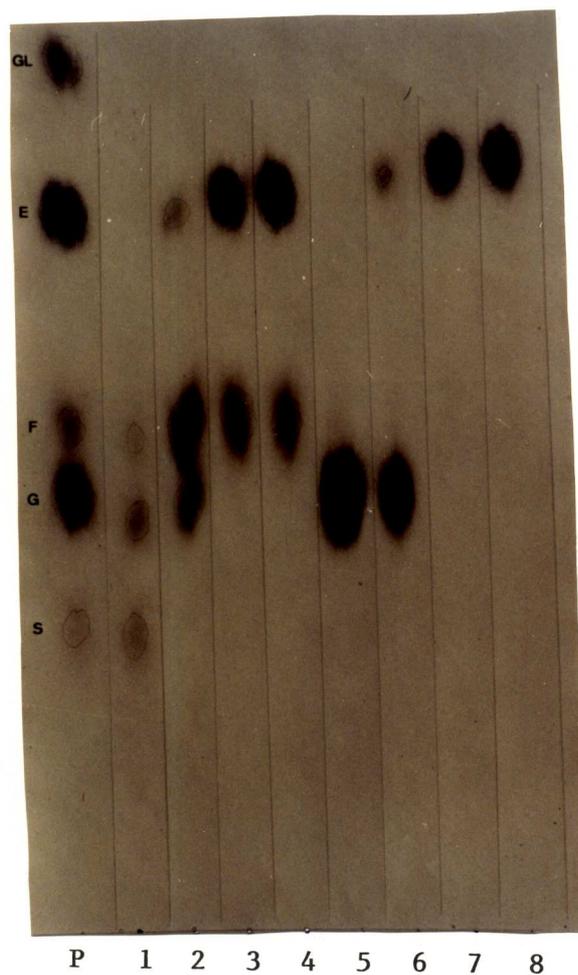


♦ P: mistura de açúcares padrões:

S= sacarose, G= glicose, F= frutose, E= eritritol, Gl= glicerol

- ♦ 1: substrato sacarose, tempo de fermentação = 24 horas
- ♦ 2: substrato sacarose, tempo de fermentação = 72 horas
- ♦ 3: substrato sacarose, tempo de fermentação = 120 horas
- ♦ 4: substrato sacarose, tempo de fermentação = 144 horas
- ♦ 5: substrato glicose, tempo de fermentação = 24 horas
- ♦ 6: substrato glicose, tempo de fermentação = 72 horas
- ♦ 7: substrato glicose, tempo de fermentação = 120 horas
- ♦ 8: substrato glicose, tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 2 - Cromatografia em papel ilustrando o perfil de utilização dos substratos glicose e sacarose e formação dos produtos pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C.

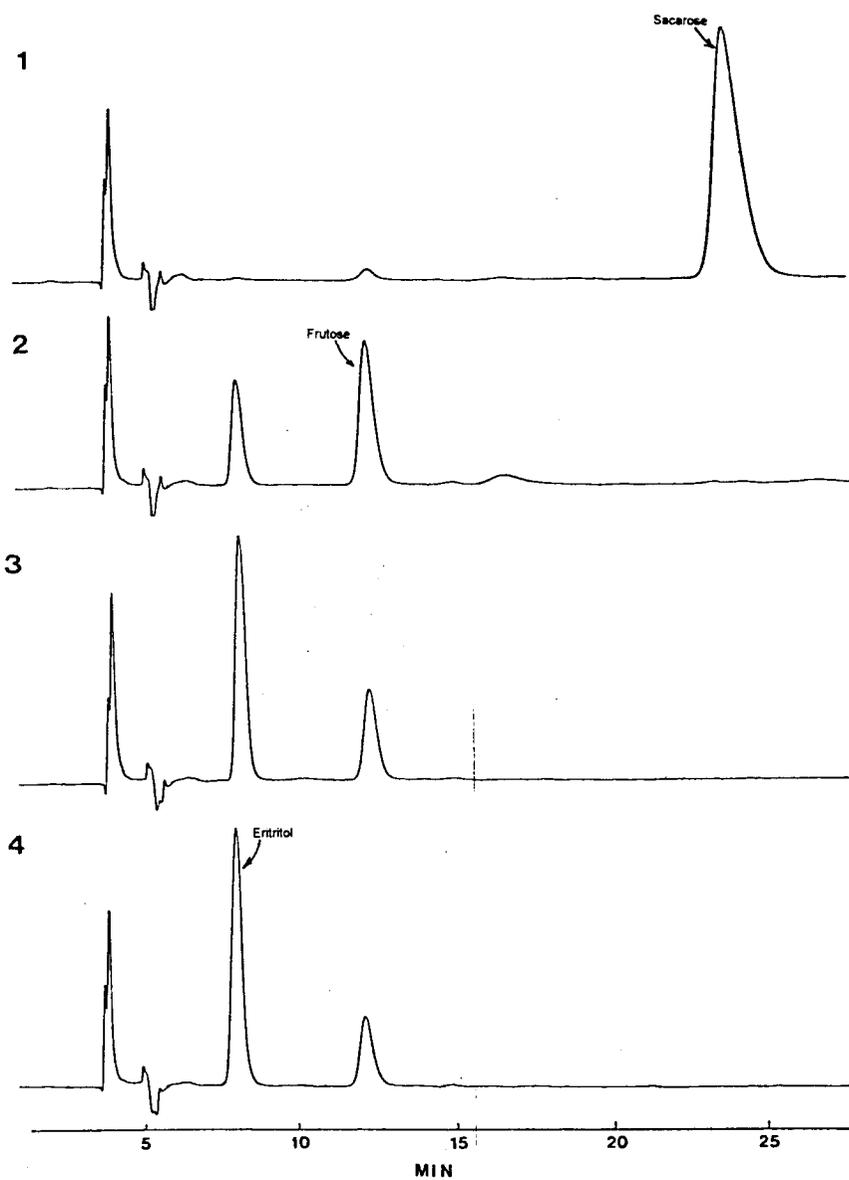


♦ P: mistura de açúcares padrões:

S= sacarose, G= glicose, F= frutose, E= eritritol, GL= glicerol

- ♦ 1: substrato sacarose, tempo de fermentação = 24 horas
- ♦ 2: substrato sacarose, tempo de fermentação = 72 horas
- ♦ 3: substrato sacarose, tempo de fermentação = 120 horas
- ♦ 4: substrato sacarose, tempo de fermentação = 144 horas
- ♦ 5: substrato glicose, tempo de fermentação = 24 horas
- ♦ 6: substrato glicose, tempo de fermentação = 72 horas
- ♦ 7: substrato glicose, tempo de fermentação = 120 horas
- ♦ 8: substrato glicose, tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 3 -Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato sacarose pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C.



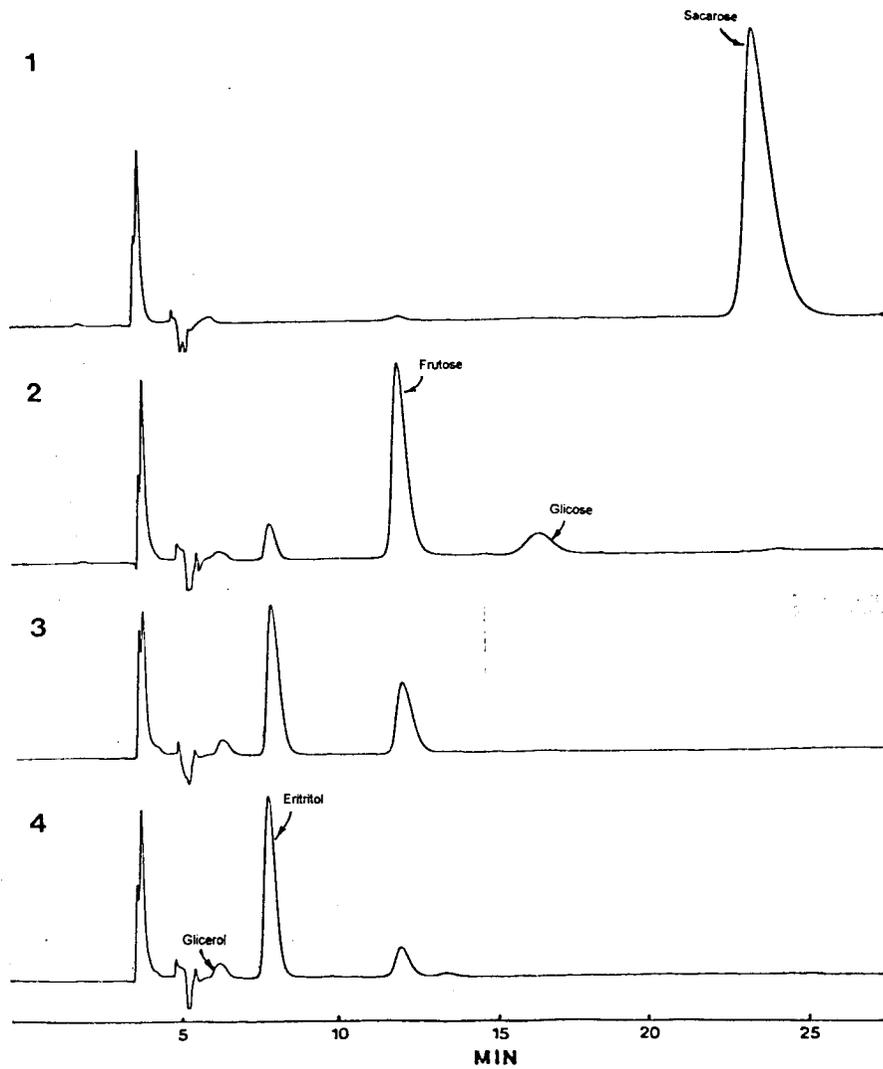
- 1 : tempo de fermentação = 24 horas
- 2 : tempo de fermentação = 72 horas
- 3 : tempo de fermentação = 120 horas
- 4 : tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 4 -Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato glicose pela linhagem 331-1 durante a fermentação a 30°C.



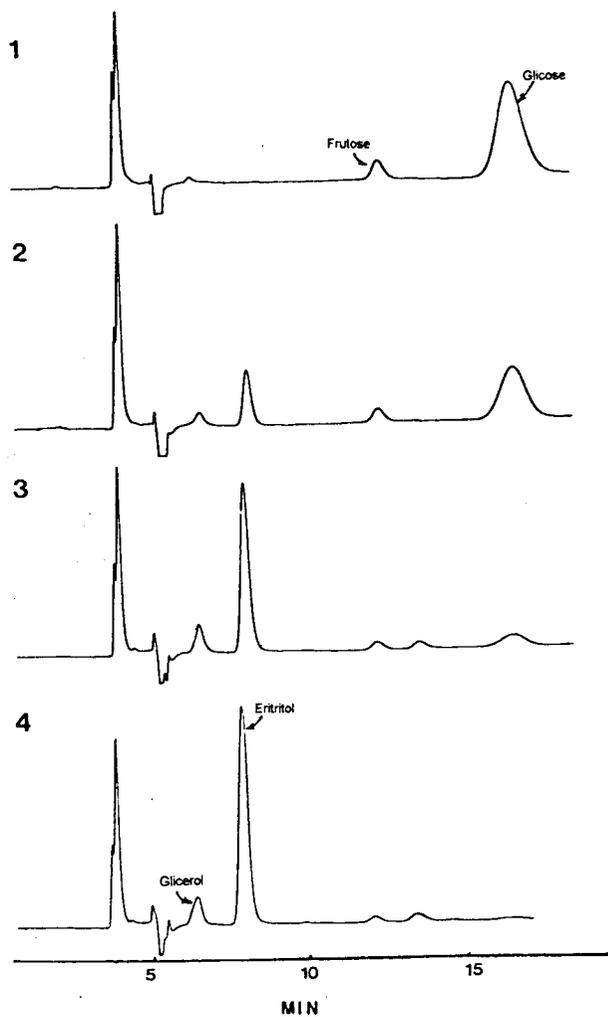
- 1 : tempo de fermentação = 24 horas
- 2 : tempo de fermentação = 72 horas
- 3 : tempo de fermentação = 120 horas
- 4 : tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 5 -Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato sacarose pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C.



- 1 : tempo de fermentação = 24 horas
- 2 : tempo de fermentação = 72 horas
- 3 : tempo de fermentação = 120 horas
- 4 : tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 6 -Cromatograma ilustrando o perfil de utilização do substrato glicose pela linhagem 150-5 durante a fermentação a 30°C.



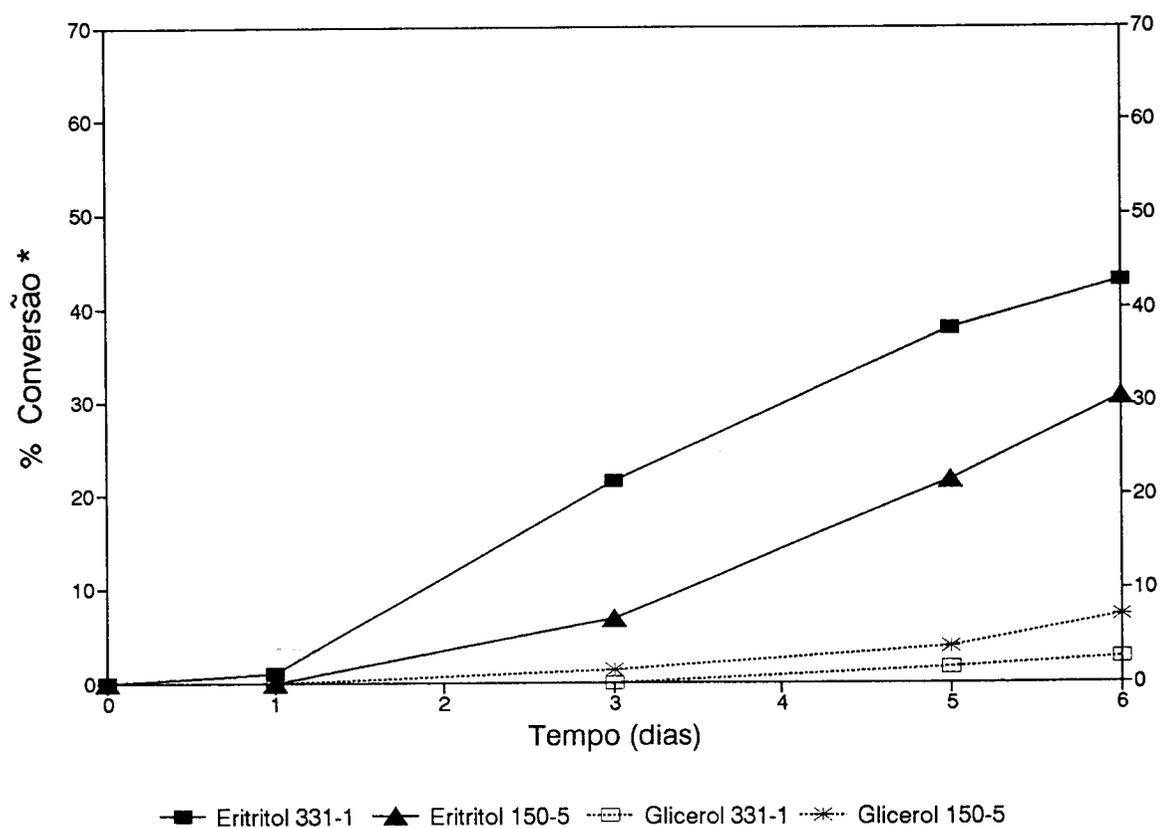
1 : tempo de fermentação = 24 horas

2 : tempo de fermentação = 72 horas

3 : tempo de fermentação = 120 horas

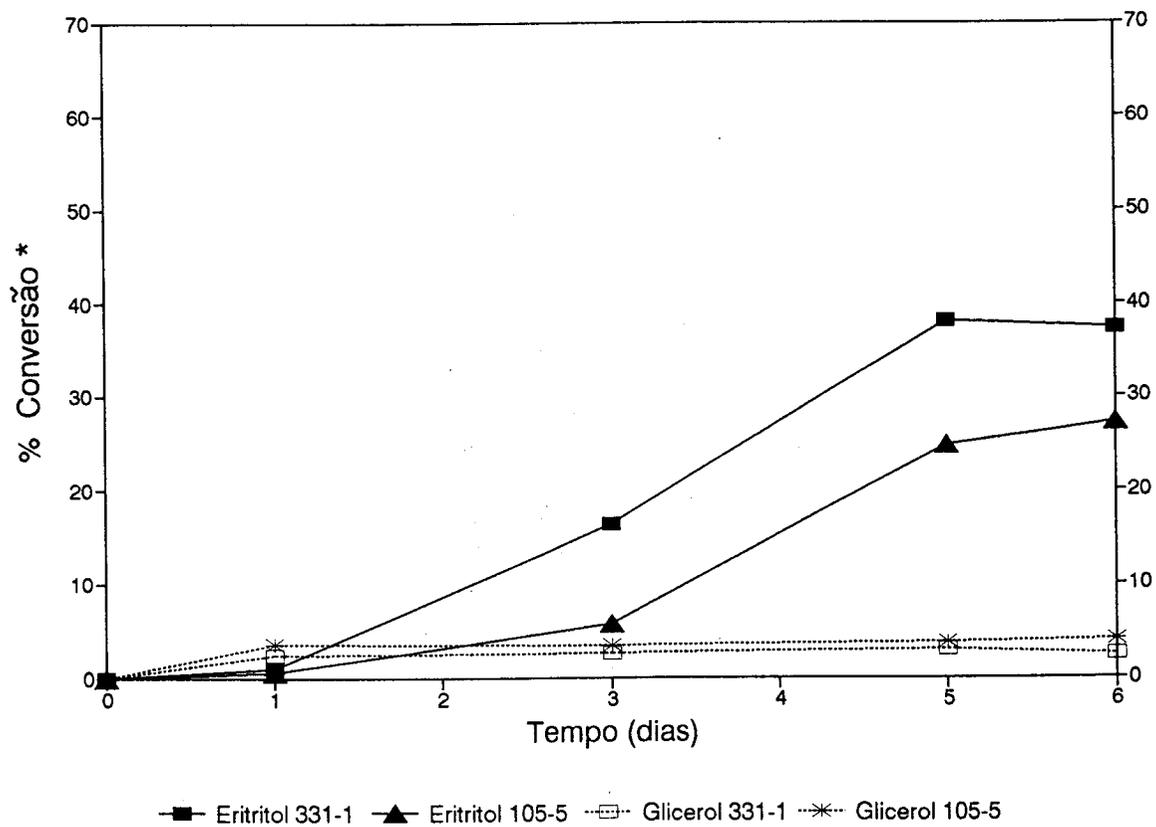
4 : tempo de fermentação = 144 horas

FIGURA 7 - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol e glicerol pelas linhagens 331-1 e 150-5 durante a fermentação a 30°C.



\*em relação à glicose consumida

FIGURA 8 - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol e glicerol pelas linhagens 331-1 e 150-5 durante a fermentação a 30°C.



\*em relação à sacarose consumida

FIGURA 9 - *Trichosporonoides sp* em meio ágar YM após 120 horas de incubação.

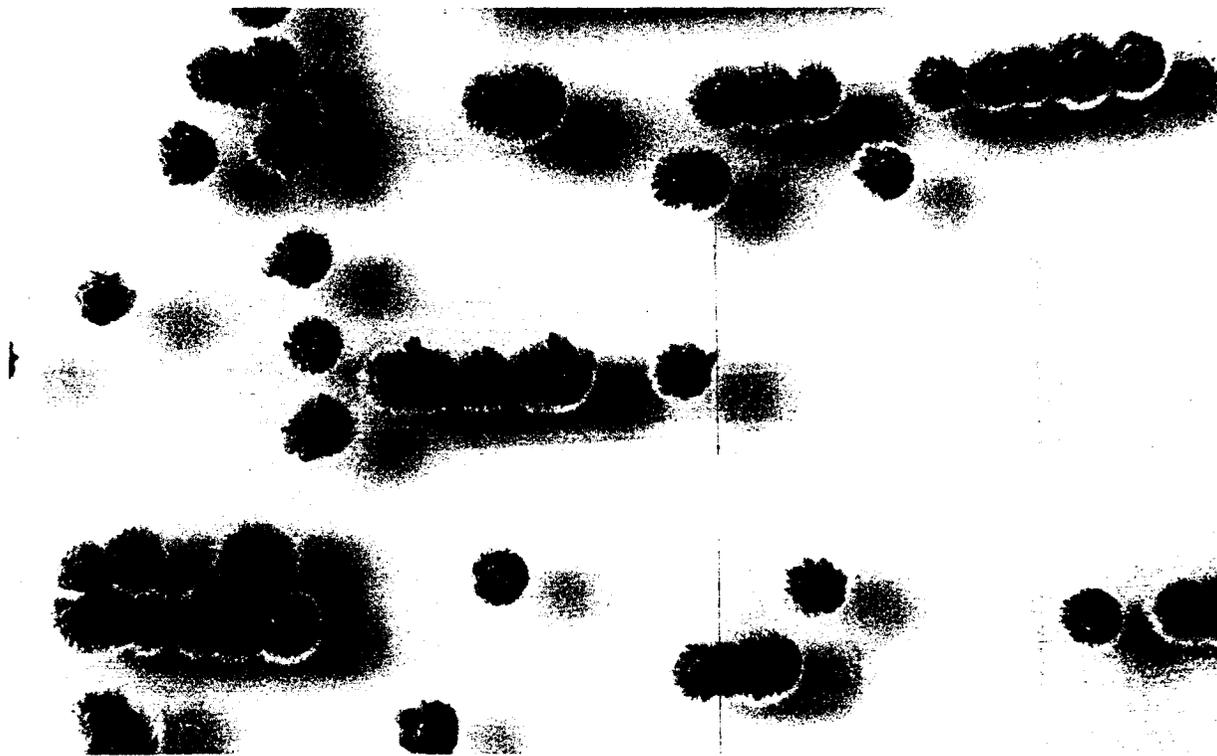
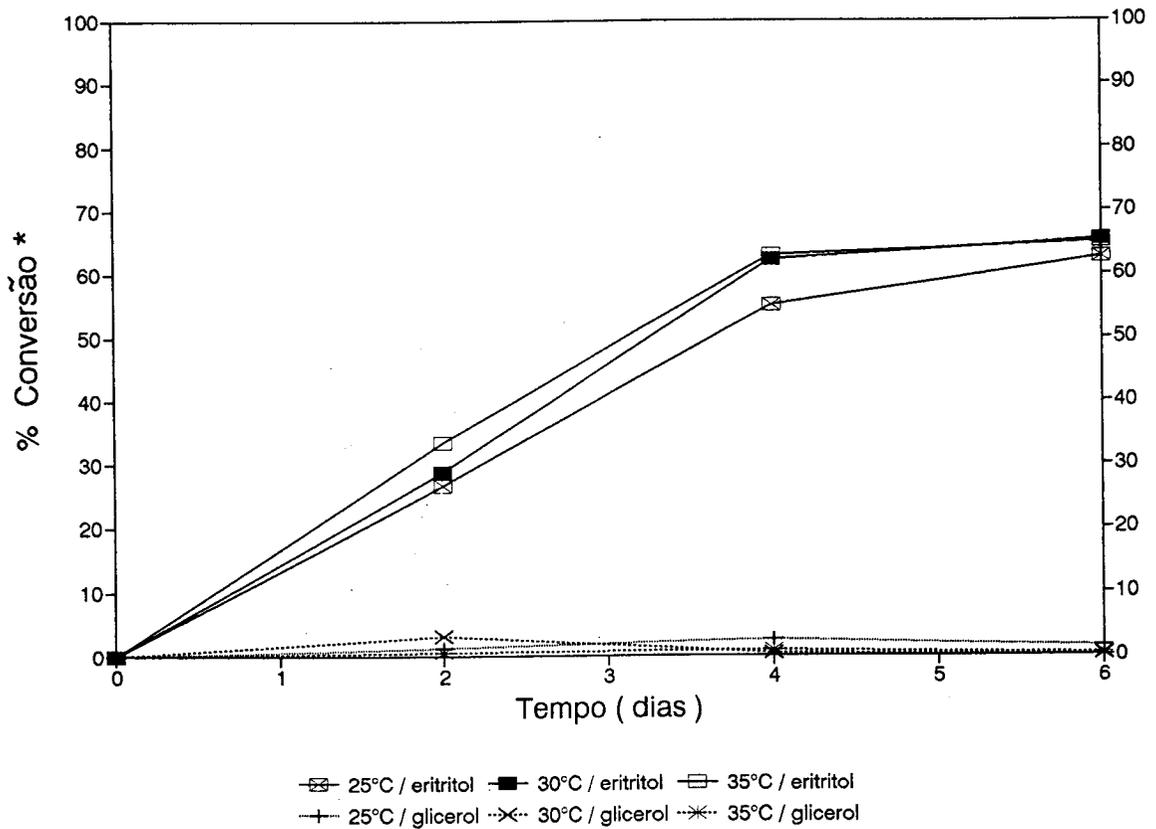
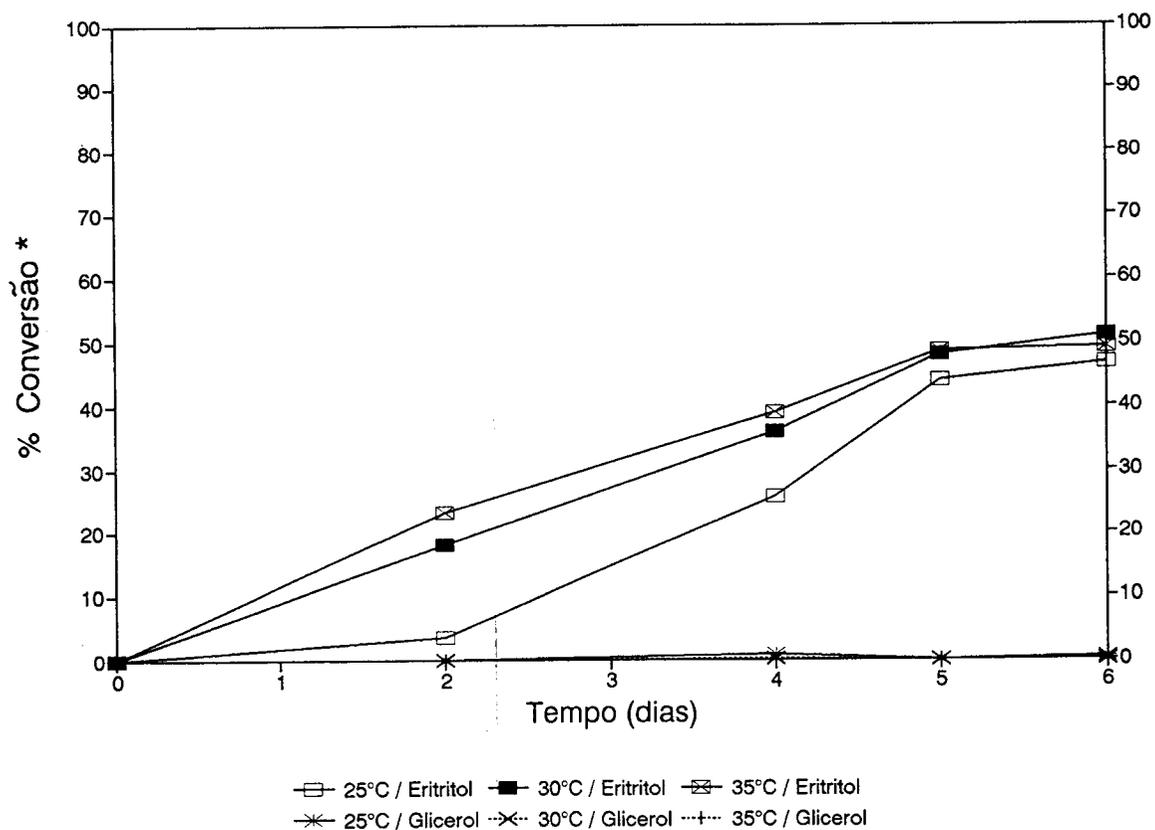


FIGURA 10 - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol e glicerol por *Trichosporonoides sp* durante a fermentação a 25°C, 30°C e 35°C.



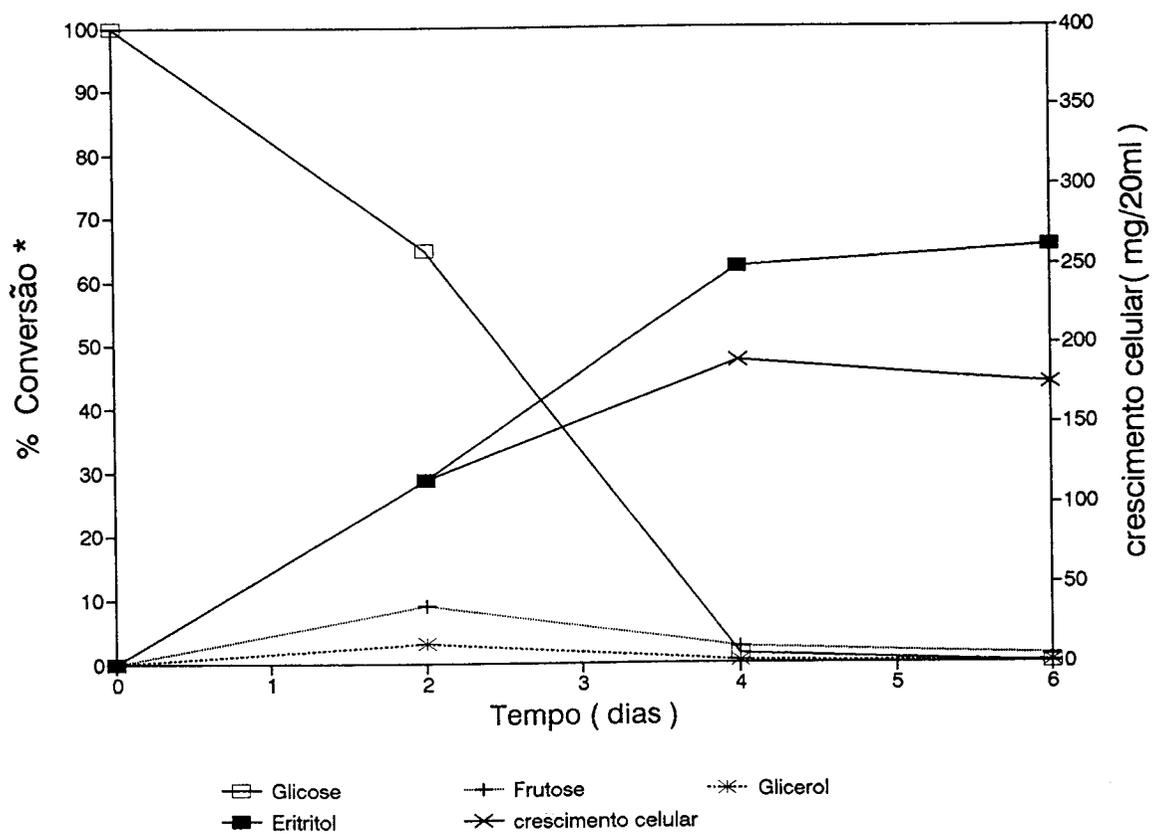
\*em relação à glicose consumida

FIGURA 11 - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol e glicerol por *Trichosporonoides sp* durante a fermentação a 25°C, 30°C e 35°C.



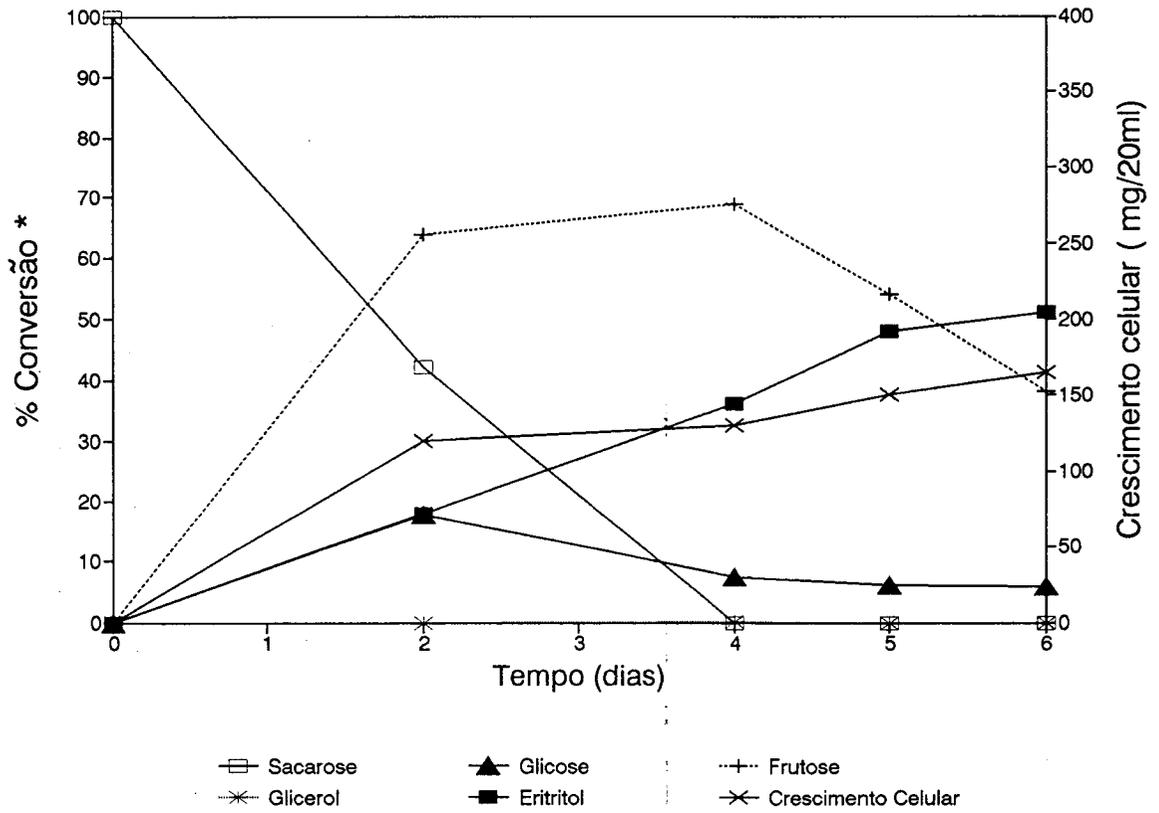
\*em relação à sacarose consumida

FIGURA 12 - Cinética de transformação do substrato glicose por *Trichosporonoides sp* e seu crescimento celular durante a fermentação a 30°C.



\*em relação à glicose consumida

FIGURA 13 - Cinética de transformação do substrato sacarose por *Trichosporonoides sp* e seu crescimento celular durante a fermentação a 30°C.



\*em relação à sacarose consumida



TABELA1- Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de reprodução da linhagem *Trichosporonoides sp.*

CARACTERÍSTICAS DA CÉLULA VEGETATIVA	COR	INICIALMENTE CREME , TRANSFORMANDO-SE EM MARROM ESCURO-ESVERDEADO COM BORDA CREME APÓS, APROXIMADAMENTE 5 DIAS DE INCUBAÇÃO
	SUPERFÍCIE	OPACA, ENRUGADA E LEVEMENTE AVELUDADA
	MARGEM	IRREGULAR E FILAMENTOSA
	ELEVAÇÃO	SIMILAR À UM VULCÃO, COM PENETRAÇÃO DA COLÔNIA NO MEIO DE CULTURA A PARTIR DO SEU CENTRO
	TEXTURA	GRANULOSA E COMPACTA
	MORFOLOGIA DA CÉLULA	PRINCIPALMENTE ESFÉRICA COM ALGUMAS RARAS FORMAS ELÍPTICAS
	FORMA DE REPRODUÇÃO VEGETATIVA	BROTAMENTO MULTIPOLAR
	FORMAÇÃO DE PSEUDOMICÉLIO	+ , TIPO CÂNDIDA
	FORMAÇÃO DE MICÉLIO VERDADEIRO	+
	FORMAÇÃO DE CONIDIOSPOROS	+
CARACTERÍSTICA SEXUAL	FORMAÇÃO DE ASCOS E ASCOSPOROS	-
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS	GLICOSE +
		SACAROSE +
		MALTOSE +
		GALACTOSE -
		LACTOSE -
	RAFINOSE -	
	ASSIMILAÇÃO DE COMPOSTOS DE CARBONO	SACAROSE +
CELOBIOSE +		
ASSIMILAÇÃO DE NITRATO	MALTOSE +	
	LACTOSE +	
	GALACTOSE -	
	XILOSE -	
TESTE DE DBB	+	
TESTE DA ATIVIDADE DE UREASE	+	

TABELA 2 - Fermentação do substrato glicose por *Trichosporonoides sp* a 25°C, 30°C, 35°C - Taxa de conversão do substrato glicose em eritritol, glicerol, glicose e frutose, e crescimento celular.

açúcar formado/ residual	tempo de fermentação (dias)	% de conversão *		
		temperatura de incubação		
		25°C	30°	35°C
Glicose	0	100,0	100,0	100,0
	2	88,0	65,0	73,0
	4	25,0	1,4	1,3
	6	0,5	0,0	2,2
Frutose	0	0,0	0,0	0,0
	2	8,8	9,1	7,2
	4	3,0	2,5	3,6
	6	1,8	1,3	1,0
Glicerol	0	0,0	0,0	0,0
	2	1,3	3,2	0,4
	4	2,5	0,2	0,9
	6	1,5	0,1	0,3
Eritritol	0	0,0	0,0	0,0
	2	26,8	28,8	33,4
	4	55,1	62,2	63,1
	6	62,7	65,4	65,1
massa celular (mg/20ml)	0	0,0	0,0	0,0
	2	110,0	115,0	100,0
	4	150,0	190,0	95,0
	5	190,0	200,0	115,0
	6	195,0	175,0	140,0

\*Em relação à glicose consumida.

TABELA 3 - Fermentação do substrato sacarose por *Trichosporonoides sp* a 25°C, 30°C, 35°C - Taxa de conversão do substrato sacarose em eritritol, glicerol, glicose e frutose, e crescimento celular.

açúcar formado/ residual	tempo de fermentação (dias)	% de conversão *		
		temperatura de incubação		
		25°C	30°	35°C
Sacarose	0	100,0	100,0	100,0
	2	55,2	42,2	16,6
	4	0,0	0,0	3,9
	5	n.d.	n.d.	0,0
	6	0,0	0,0	0,0
Glicose	0	0,0	0,0	0,0
	2	42,9	17,9	30,6
	4	26,7	7,4	16,3
	5	n.d.	n.d.	7,5
	6	2,6	5,8	7,3
Frutose	0	0,0	0,0	0,0
	2	57,3	63,8	63,8
	4	85,1	67,8	58,8
	5	n.d.	n.d.	34,5
	6	48,9	38,1	42,7
Glicerol	0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0
	4	0,9	0,1	0,0
	5	n.d.	n.d.	0,0
	6	0,2	0,0	0,0
Eritritol	0	0,0	0,0	0,0
	2	3,6	18,1	23,2
	4	25,7	36,1	39,1
	5	46,0	49,5	52,4
	6	46,7	51,0	49,1
massa celular (mg/20ml)	0	0,0	0,0	0,0
	2	95,0	120,0	115,0
	4	140,0	130,0	120,0
	5	160,0	150,0	125,0
	6	170,0	165,0	120,0

n.d. = não determinado

\*Em relação à sacarose consumida

## ANEXOS

## ANEXO 1- MEIO ÁGAR YM ("yeast malt agar")

### Composição

extrato de malte	3g
extrato de levedura	3g
peptona	5g
glicose	10g
ágar	20g
água destilada	1000 ml

Dissolver os reagentes em água destilada e levar ao fogo até a dissolução do ágar. Dispensar 7 ml do meio em tubos de ensaio, autoclavar a 121°C por 15 minutos e inclinar os tubos até a solidificação.

Dispensar uma camada do meio em placa de Petri e deixar solidificar.

## ANEXO 2- MEIO ÁGAR CMA ("corn meal agar")

### Composição

corn meal agar (DIFCO)	17g
água destilada	1000ml

Dissolver o reagente em água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Dispensar uma camada do meio em placa de Petri e deixar solidificar.

## ANEXO 3- MEIO ÁGAR ACETATO DE FOWELL

### Composição

acetato de sódio triidratado	5g
ágar	20 g
água destilada	1000ml

Dissolver os reagentes em água destilada, ajustar o pH entre 6,7 - 7,0 e levar ao fogo até total dissolução do ágar. Dispensar 7 ml do meio em tubos de ensaio, autoclavar a 121°C por 15 minutos e inclinar os tubos até solidificação.

## ANEXO 4- MEIO ÁGAR ACETATO DE MCCLARY

### Composição

glicose	0,1%
cloreto de potássio	0,18%
extrato de levedura	0,25%
acetato de sódio triidratado	0,82%
ágar	1,5%

Dissolver os reagentes em água destilada e levar ao fogo até total dissolução do ágar. Dispensar 7 ml do meio em tubos de ensaio, autoclavar a 121°C por 15 minutos e inclinar os tubos até solidificação.

## ANEXO 5- MEIO LEVEDURA AUTOLIZADA

Dissolver 20 g de levedura de pão em 100 ml de água destilada, ajustar o pH para 4,2 e incubar a 50°C durante 24 horas.

Adicionar 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 3 g ágar e levar ao fogo até total dissolução do ágar. Dispensar 7 ml do meio em tubos de ensaio, autoclavar a 121°C por 15 minutos e inclinar os tubos até solidificação.

## ANEXO 6- COLORAÇÃO DE ESPOROS

- suspender a levedura em água destilada sobre lâmina de vidro e fixar em chama de bico de Bunsen;
- colocar solução de verde de malaquita (5%) e aquecer a 80°C durante 3 a 5 minutos;
- lavar com água destilada;
- corar com solução de safranina (0,5%) durante 10 segundos.

## ANEXO 7- FERMENTAÇÃO DE COMPOSTOS DE CARBONO

Preparar solução constituída de 4,5 g de extrato de levedura e 7,5 g de peptona (DIFCO) em 1000 ml de água destilada em frasco de Erlenmeyer e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Esterilizar em tubos de ensaio, 4 ml de solução 6% de fonte de carbono: glicose, sacarose, galactose e maltose. Colocar um tubo de Duhram em cada tubo de ensaio.

Procedimento: transferir 8 ml de meio contendo extrato de levedura e peptona para cada tubo contendo 4 ml de solução de fonte de carbono (6%).

## ANEXO 8- MEIO DE ASSIMILAÇÃO DE NITRATO

Preparar solução constituída de 11,7 g de YCB ("yeast carbon base") e 0,78 g de  $\text{KNO}_3$  em 1000 ml de água destilada; distribuir 5 ml do meio em tubos e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Reagente I- dissolver 0,4 g de ácido sulfanílico em 50 ml de solução de ácido acético 5N.

Reagente II- dissolver 0,5 g de  $\alpha$ -naftilamina em 50 ml de solução de ácido acético 5N.

## ANEXO 9- MEIO ÁGAR GYP

### Composição

glicose	20 g
extrato de levedura	5 g
peptona	10 g
ágar	20 g
água destilada	1000 ml

Dissolver os reagentes em água destilada e levar ao fogo até total dissolução do ágar, autoclavar a 121°C por 15 minutos; dispensar uma camada do meio em placa de Petri e deixar solidificar.

## ANEXO 10- MEIO ÁGAR URÉIA

### Composição

glicose	1 g
peptona	1 g
NaCl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
solução vermelho de fenol *	10 ml
ágar	20 g
água destilada	1000 ml

Dissolver os reagentes em água destilada, ajustar o pH para 6,8 e levar ao fogo até total dissolução do ágar. Dispensar 4,5 ml do meio em tubos de ensaio, autoclavar, adicionar 0,5 ml de solução de uréia a 20% esterilizada por filtração. Dissolver e inclinar os tubos até solidificação.

\*Solução de vermelho de fenol:

vermelho de fenol	60 mg
água destilada	50 ml
álcool	10 ml

Dissolver o vermelho de fenol no álcool e completar o volume com água destilada. Ajustar o pH para 6,8 e armazenar sob refrigeração.

## 5- CONCLUSÕES:

- O microrganismo isolado e selecionado como melhor produtor de eritritol foi identificado como *Trichosporonoides sp.*

- A produção máxima de eritritol por *Trichosporonoides sp* em meio constituído de 10% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia ajustado a pH 6,2 - 6,4 foi de cerca de 65 mg/ml obtida após 5 a 6 dias de fermentação a 30°C ou 35°C.

- A produção máxima de eritritol por *Trichosporonoides sp* em meio constituído de 10% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia ajustado a pH 6,2 - 6,4, foi de cerca de 48 mg/ml obtida após 5 a 6 dias de fermentação a 30°C ou 35°C.

- Para *Trichosporonoides sp*, a glicose mostrou ser a fonte de carbono mais apropriada para produção de eritritol. A percentagem máxima de conversão de glicose em eritritol foi de cerca de 65,4% e a de conversão de sacarose em eritritol foi de 48,6% aproximadamente.

## SUGESTÕES PARA PRÓXIMO TRABALHO:

Para complementação deste trabalho serão estudados futuramente:

- a influência do pH e da taxa de aeração na fermentação e produção de eritritol;
- efeito de nutrientes assim como as necessidades vitamínicas, sais orgânicos e inorgânicos na fermentação e produção de eritritol;
- propriedades da enzima-chave eritrose redutase;
- isolamento e seleção de linhagens mutantes com maior capacidade de conversão do substrato em eritritol.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- BINKLEY, W.W; WOLFROM, M.L. - Chromatografic fractionation of cane blackstrap molasses and of ots fermentation residue. J. Am. Chem. Soc. **72**: 4778-82, 1950.

2- HAJNY, G.J.; SMITH, J.H.; GARVER, J.C. - Erythritol production by a yeastlike fungus. Appl. Microbiol. **12** (3): 240-46, 1964.

3- HASKINS, R.H.; SPENCER, J.F.T. - *Trichosporonoides oedocephalis* n.gen., n.sp. Can. J. Bot. **45**: 515-26, 1967.

4- HATTORI, K.; SUZUKI, T. - Production of erythritol by n-alkane-grown yeasts. Agr. Biol. Chem. **38** (3): 581-86, 1974a.

5- HATTORI, K.; SUZUKI, T. - Large scale production of erythritol and its conversion to D-manitol production by n-alkane-grown *Candida zeylanoides*. Agr. Biol. Chem. **38** (6): 1203-08, 1974b.

6- HOOG, G.S.; MCGINNIS, M.R. - Ascomycetous black yeasts. In: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE PERSPECTIVES OF TAXONOMY, ECOLOGY AND PHYLOGENY OF YEASTS AND YEAST-LIKE FUNGI, Amersfoort, 1987. Proceedings. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1987, p.187-99.

7- ISHIZUKA, H.; TOKUOKA, K.; SASAKI, T.; TANIGUCHI, H. - Purification and some properties of an erythrose reductase from an *Aureobasidium sp* mutante. Biosci. Biotech. Biochem. **56** (6): 941-45, 1992.

8- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. -The yeasts, a taxonomic study. Groningen, Elsevier Science Publishers B. V.; Amsterdam, 1984. 1082p.

9- MOORE, R.T. - Micromorphology of yeasts and yeast-like fungi and its taxonomic implications. In: PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE PERSPECTIVES OF TAXONOMY, ECOLOGY AND PHYLOGENY OF YEASTS AND

YEAST-LIKE FUNGI, Amersfoort, 1987. Proceedings. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1987, p.203-26.

10- ODA, T.; KUSAKABE, M.; SASAKI, T. - Produção de eritritol e sua aplicação prática na tecnologia de alimentos. Shokuhin Kougyo 32 (4): 41-48, 1989.

11- ODA, T.; SASAKI, T. - Erythritol, biotechnology production. New Food Ind. 35 (4): 38-45, 1993.

12- OTEY, F.H.; SLOAN, J.W.; WILHAN, C.A.; MEHLTRETTER, C.L. - Erythritol and ethylene glycol from dialdehyde starch. Ind. and Eng. Chem. 53 (4): 267-68, 1961.

13- SASAKI, T. - Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. Nippon Nougai Kagaku Kaishi 63 (6): 1130-32, 1989.

14- SASAKI, T.; ODA, T.; KAINUMA, T. - Development of techniques for continuous production of a novel sweetener, erythritol, by fermentation using *Aureobasidium sp.* Biosci. and Ind. 46 (6): 3295-98, 1988.

15- SPENCER, J.F.T.; SALLANS, H.R. - Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. Can. J. Microbiol. 2: 72-79, 1956.

16- SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. - Production of polyhydric alcohols by osmotolerant yeasts. In: ROSE, A.H., Economic Microbiology: primary products of metabolism, 2. London, Academic Press Inc. Ltd., 1978. cap. 10, p.393-423.

17- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. - Detection of sugars on the paper chromatograms. Nature 166: 444-45, 1950.

18- VEIGA-DA-CUNHA, M.; FIRME, P.; ROMÃO, M.V.S.; SANTOS, H. - Application of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. Appl. and Envir. Microbiol. 58 (7): 2271-79, 1992.

19- WAKO, K.; ISHIZUKA, H.; KAWAGUCHI, G.; KUBO, N.; KASUMI, T.; HAYASHI, K. - Erythritol production by *Aureobasidium sp* SN-115. Hakkokogaku Kaishi 66 (4): 317-23, 1988.

20- WAKO, K.; KAWAGUCHI, G.; KUBO, N.; KASUMI, T.; HAYASHI, K.; IINO, K. - Newly isolated yeasts producing high yields of polyols. Hakkokogaku Kaishi 66 (4): 209-15, 1988.