



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

Estudo e otimização da produção da dextranasacarase e caracterização da dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área Microbiologia Aplicada.

Abril - 2011

**Estudo e otimização da produção da
dextranasacarase e caracterização da dextrana
produzida por *Leuconostoc mesenteroides*
FT045B**

MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

Orientador: Jonas Contiero

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas,
área Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro
Abril – 2011**

547.758 Vettori, Mary Helen Palmuti Braga
V592e Estudo e otimização da produção da dextranasacarase e
caracterização da dextrana produzida por *Leuconostoc*
mesenteroides FT045B / Mary Helen Palmuti Braga Vettori. -
Rio Claro : [s.n.], 2011
117 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Enzimas. 2. Delineamento composto central. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

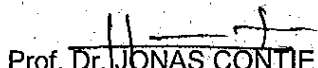
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo e otimização da produção da dextranase e caracterização da dextrana por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

AUTORA: MARY HELEN PALMUTI BRAGA VETTORI

ORIENTADOR: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

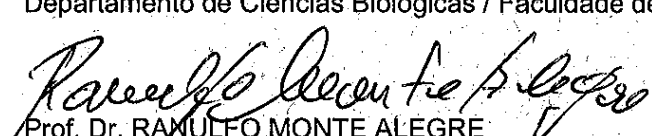
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis


Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

Departamento de Engenharia de Alimentos / Universidade Estadual de Campinas

Data da realização: 08 de abril de 2011.

Para meu marido Carlos, por sempre providenciar um plano B para nossa vida e por me deixar chamá-lo de Mo.

Para Sofia, que representa toda nossa esperança.
E em memória da nossa menininha Melissa, que deixou o “baico” muito cedo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Jonas Contiero que com muito carinho, sempre me orientou com sabedoria. Ele me acolheu quando precisei e desde então sempre foi compreensivo, amigo, e leal. Ele teve paciência, me entendeu nos momentos difíceis e me apoiou nas decisões e caminhos que decidi tomar.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos do lab (Kate, Mariana, Roberta, Luciana, Fabrício, Paulo, Túlio, Vinicius, Cristian, Rodrigo, Marcela e Paola) que foram grandes companheiros durante estes dois anos que estivemos juntos.

Agradeço à Fapesp por me apoiar financeiramente, confiando no trabalho. Enfim, são estes os fatores importantes que tornam possível alcançar objetivos, pois quando você se sente querido no lugar onde trabalha, tudo se torna empolgante e você vive mais feliz. Eu adorei ter tido estas pessoas comigo durante meu mestrado.

Obrigada pessoal.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Objetivos.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Dextrana: características gerais	12
2.2. Dextrana: da descoberta até a produção comercial	13
2.3. Dextrana: efeitos negativos	14
2.4. Estrutura da Dextrana	14
2.5. Aplicações	14
2.6. Processo de produção convencional e produção por via enzimática.....	16
2.7. Meio de Cultivo	17
2.8. Estabilidade enzimática	17
2.9. Mecanismos de ação da enzima dextranasacarase	18
2.10. Cepas utilizadas para produção de dextranasacarase	18
2.11. Aeração.....	21
2.12. Agitação.....	23
2.13. Uso de Sacarose como substrato	23
2.14. Relação carbono/nitrogênio.....	25
2.15. Efeito da temperatura na produção de dextranasacarase	25
2.16. Efeito do pH na produção de dextranasacarase	26
2.17. Análise da Atividade Enzimática da Dextranasacarase.....	28
2.18. Estrutura da dextrana	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Estudo comparativo de 11 diferentes métodos para Análise da Atividade da Dextranasacarase e enzimas relacionadas	30
3.1.1. Método (I) de precipitação / ¹⁴ C-Sacarose	30
3.1.2. Método (II) ¹⁴ C-Sacarose.....	31
3.1.3. Método (III) Gravimétrico.....	31
3.1.4. Método (IV) Medição da dextrana em CCD por densitometria quantitativa	32
3.1.5. Método (V) Medição de fructose em CCD por densitometria quantitativa	33
3.1.6. Método (VI) DNS coletando amostras diretamente do meio reacional.....	34
3.1.7. Método (VII) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) usando DNS	35

3.1.8. Método (VIII) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) por Cu-bicincroninato de cobre.....	36
3.1.9. Método (IX) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) por ferricianeto + arsenomolibdato alcalino.	37
3.1.10. Método (X) Medição direta da frutose e da glucose na reação de digestão por D-frutose e D-glucose Megazyme Kit.....	38
3.1.11. Método (XI) de análise da dextrana, precipitada 3 vezes e seca, por fenol-ácido sulfúrico para determinação dos carboidratos totais.....	39
3.1.12. Determinação dos terminais redutores de maltodextrinas.....	40
3.2. Caracterização da nova dextrana produzida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> FT045B	40
3.2.1. Organismo	40
3.2.2. Enzimas	40
3.2.3. Dextrana referência.....	41
3.2.4. Produção de Dextrana.....	41
3.2.5. A massa molar média e o grau de polimerização	42
3.2.6. Hidrólise da dextrana por endodextranase.....	42
3.2.7. Análise dos produtos da hidrólise, usando cromatografia em camada delgada	42
3.2.8. Valores redutores dos produtos da hidrólise da dextrana	43
3.2.9. Reação do aceptor com maltose e sacarose (1:1)	43
3.2.10. Análise dos produtos da reação do aceptor da dextranasacarase usando CCD.....	43
3.2.11. Espectroscopia de ¹ H NMR	44
3.2.12. Análise de espectrofotometria de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	44
3.3. Otimização do meio de cultura para produção de dextranasacarase	44
3.3.1. Micro-organismo	44
3.3.2. Fonte de Carbono	44
3.3.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	44
3.3.4. Meios de cultura	46
3.3.5. Preparo da cultura estoque e preservação do micro-organismo.	48
3.3.6. Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência de 15 diferentes meios de cultura na produção da enzima.....	48
3.3.7. Preparo do pré-inoculo	48
3.3.8. Preparo do meio de cultivo.....	49
3.3.9. Determinação da concentração celular	49
3.3.10. Determinação de ART (açúcar redutor total)	50
3.3.11. Determinação da Atividade Enzimática	51
3.3.12. Produção de dextranasacarase em biorreator.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

4.1. Estudo comparativo de 11 diferentes métodos para Análise da Atividade da Dextranasacarase e enzimas relacionadas	53
4.1.2. Atividade da dextranasacarase produzida pela linhagem de <i>L. mesenteroides</i> obtida no Brasil.....	58
4.2. Caracterização da nova dextrana produzida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> FT045B	58
4.3. Otimização da produção de dextranasacarase	66
4.3.1. Otimização do meio de cultura por DCCR - Atividade Enzimática.....	66
4.3.2. Otimização do meio de cultura por DCCR - Concentração celular	73
4.3.3. Consumo de Substrato e pH	80
4.4. Otimização da relação taxa de aeração/velocidade de agitação	84
4.4.1. Otimização das condições de cultura por PFC - Atividade Enzimática.....	84
4.4.2. Otimização das condições de cultura por PFC - Concentração celular.....	90
4.4.3. Consumo de Substrato	97
5. CONCLUSÕES	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

RESUMO

Um estudo comparativo de onze métodos para determinação da atividade da dextranasacarase e de enzimas relacionadas foi realizado. Atualmente existem dois métodos usualmente empregados na determinação da atividade da dextranasacarase. Um método relativamente difundido para a reação da enzima com a sacarose consiste na medição dos valores redutores da D-frutose pelo reagente 3,5-dinitrosalicilato (DNS). Outro método é a reação da enzima com ^{14}C -sacarose, pela adição de uma alíquota da reação em papel de filtro Whatman 3MM, que posteriormente é lavado com metanol para a remoção da ^{14}C -D-frutose e da ^{14}C -sacarose não reagida, seguido da quantificação de ^{14}C -dextrana por contador de cintilação líquida (CCL). Foi mostrado, pelo estudo realizado, que ambos os métodos geram dados errados. O método por quantificação do valor redutor proporciona resultados extremamente altos devido à oxidação tanto da D-frutose quanto da dextrana, e o método do ^{14}C -papel gera resultados significativamente baixos devido à remoção de parte da ^{14}C -dextrana do papel, pela lavagem em metanol. Neste trabalho, foram testados onze métodos, dentre os quais, dois apresentaram resultados idênticos, sendo considerados métodos confiáveis de medição da atividade da dextranasacarase.

Este trabalho também reporta a caracterização físico-química de uma nova dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. A estrutura química do polímero foi caracterizada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e por Espectroscopia de ^1H Ressonância Magnética Nuclear. A dextrana produzida foi hidrolisada por endodextranase e seus produtos da reação do aceptor com maltose foram analisados por cromatografia em camada delgada e comparados com a dextrana comercial B512F obtida da Sigma Company. A massa molecular média e o grau de polimerização da dextrana produzida foram determinados através da medição do valor redutor usando o método bicinroninato de cobre e a quantificação dos carboidratos totais usando o método fenol-ácido sulfúrico. Todos os dados obtidos revelaram que a estrutura da nova dextrana é bastante similar à dextrana comercial B512F, e que é composta por resíduos de D-glicose que estruturam a cadeia principal com ligações α -(1,6) (95%) e poucas ramificações α -(1,3) (menos de 5%).

A metodologia de superfície de resposta baseada em planejamentos experimentais como o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e o Planejamento

Fatorial Completo (PFC) foi aplicada para otimizar a produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Três componentes do meio de cultura, Melaço de Cana de Açúcar (MCA), Água de Maceração de Milho (AMM) e Fosfato Bibásico de Potássio (K_2HPO_4) foram testados quanto sua significância, usando DCCR. Os efeitos combinados destes nutrientes na atividade da dextranasacarase foram usados para avaliar a Velocidade de Agitação (VA) e a Taxa de Aeração (TA) por PFC. O aumento das concentrações de AMM e K_2HPO_4 e o aumento da TA mostraram efeito positivo significativo na produção enzimática. As superfícies de resposta demonstraram que os melhores resultados para a atividade da dextranasacarase (4,03 IU/mL) foram obtidos com a faixa otimizada de 16 a 21,77 g/L de AMM, 32 a 44 g/L de MCA e 26 a 28,41 de K_2HPO_4 em 24h de fermentação em termo agitador *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B. O maior resultado obtido para a atividade da dextranasacarase pela otimização de produção através da combinação da TA (1,0 vvm) e da VA (100 rpm) foi de 3,99 IU/mL.

ABSTRACT

A comparative study of nine assay methods for dextransucrase and related enzymes has been made. A relatively widespread method for the reaction of the enzyme with sucrose, is the measurement of the reducing value of D-fructose by alkaline 3,5-dinitrosalicylate (DNS). Another method is the reaction with ^{14}C -sucrose, with the addition of an aliquot to Whatman 3MM paper squares that are washed 3-times with methanol to remove ^{14}C -D-fructose and unreacted ^{14}C -sucrose, followed by counting of ^{14}C -dextran on the paper by liquid scintillation counting (LSC). It is shown that both methods give erroneous results. The reducing value method gives extremely high values due to over-oxidation of both D-fructose and dextran, and the ^{14}C -paper square method gives significantly low values due to the removal of some of the ^{14}C -dextran from the paper, by the methanol washes. In the present study, we have examined nine methods and find two that give values that are identical and are an accurate measurement of the dextransucrase reaction. This work also reports the physical and chemical characterization of a new dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. The chemical structure of the polymer was characterized through Fourier transform infrared spectroscopy and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. The dextran produced was hydrolyzed by endodextranase and its

products from the acceptor reaction with maltose were analyzed using thin layer chromatography and compared with those of a commercial native dextran B512-F obtained from the Sigma Company. The average molecular weight and degree of polymerization of the dextran produced were determined through the measurement of the reducing value using the copper bichinchoninate method and the measurement of the total carbohydrates using the phenol-sulfuric acid method. All data revealed a very similar structure to that of the commercial dextran B512F from Sigma, composed of d-glucose residues structuring a linear chain with α -(1,6) linkages (95%) and little α -(1,3) branching (less than 5%). Response surface methodology based on experimental designs, Central Composite Design (CCD) and Full Factorial Design (FFD), were applied to enhance dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Three medium components, sugar cane molasses (SCM), corn steep liquor (CSL) and K_2HPO_4 , were first examined for their significance using CCD. The combined effects of these nutrients on dextransucrase activity were used to evaluate Agitation Speed (AS) and Aeration Rate (AR) by FFD. CSL concentration, AR and AS showed significant effect on enzyme production. The dextransucrase activity enhances when CSL and K_2HPO_4 concentration increase and when AR and AS decrease. The optimization of the analyzed responses demonstrated that the best results for dextransucrase activity (4.03 IU/mL) were obtained with an optimal range of 16 to 21.77 g/L of CSL, 32 to 44 g/L of SCM and 26 to 28.41 of K_2HPO_4 in 24 h of fermentation in termo shaker by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B. The highest resulted obtained to dextransucrase activity with optimization of dextransucrase production by combination of AR (1.0 vvm) and AS (100 rpm) was 3.99 IU/mL.

Palavras-chave: dextranasacarase. ácido 3,5-dinitrosalicílico. dextran. *Leuconostoc mesenteoides*. caracterização estrutural. delineamento composto central. otimização de meio de cultura. superfície de resposta. aeração. agitação. planejamento fatorial completo. melaço de cana de açúcar. água de maceração de milho.

1. INTRODUÇÃO

O relevante emprego de polímeros na sociedade moderna, fez com que houvesse considerável desenvolvimento tecnológico em torno de sua produção a partir do petróleo. Embora a indústria de polímeros tenha passado por redução na produção devido à crise financeira de 2008/2009, o setor mostra tendência de recuperação, sendo que a produção global, em 2008, foi de 245 milhões de toneladas em comparação com 2007 que foi de 260 milhões de toneladas (PLASTICSEUROPE, 2009).

Contudo o petróleo vem apresentando altas sucessivas de preço e limitação crescente de disponibilidade, tornando desta forma, imprescindível o desenvolvimento de biopolímeros provenientes de recursos renováveis através das biorrefinarias.

Os polímeros de origem bacteriana, também chamados de biopolímeros ou “polímeros verdes” são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas e têm sido objeto de muitos estudos, em especial os biopolissacarídeos, devido as suas bem sucedidas aplicações industriais. A matéria-prima principal para sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de plantios comerciais de larga escala como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa (PRADELLA, 2006).

O biopolímero Dextrana é um homopolissacarídeo formado por unidades D-glucopiranosil, os tipos de ligações presentes variam de acordo com o micro-organismo produtor (BROWN e MCAVOY, 1990). A maioria da Dextrana é sintetizada a partir da sacarose processada pela enzima dextranasacarase, que é secretada pelas bactérias agrupadas na família *Lactobacillaceae* e mais especificamente nos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, mas a cepa mais amplamente utilizada em pesquisas e industrialmente é *Leuconostoc mesenteroides* (CHLUDZINSKI, GERMAINE e SCHACHTELE, 1974; HEHRE, 1956; SIDEBOTHAM, 1974; ROBYT, 1985; TAKAGI, IOROI et al., 1994) e a linhagem que recebe maior atenção e tem sido utilizada para a produção de dextrana comercialmente é a NRRL B512F (ROBYT e WALSETH, 1979; ALSOP, 1983; JEANES, HAYNES et al., 1954; LINDBERG e SVENSSON, 1968).

A Dextrana também pode ser sintetizada a partir da maltodextrina pela ação da atividade da enzima dextrana dextrinase de certas linhagens de *Gluconobacter* (HEHRE e HAMILTON, 1949; BARKER, BOURNE et al., 1958) e por síntese química (HEHRE, 1956; RUCKEL e SCHUERCH, 1967).

Mesmo 136 anos após sua descoberta, as áreas de aplicação parecem estar longe de ter esgotado todas as possibilidades de uso deste incrível material. Novas aplicações têm surgido constantemente aumentando consideravelmente a demanda de dextrana (SCHEIBLER, 1874).

O crescente interesse em aplicações específicas da dextrana não se deve somente ao fato de se tratar de produto com características hidrofílicas, por ser estável e puro e com habilidades de formar soluções claras e estáveis, mas também pelo fato da Dextrana ser derivada de recursos renováveis e de ser biodegradável.

1.1. Objetivos

- Otimização do meio de fermentação para produção de dextranasacarase, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B;
- Caracterização da dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B;
- Desenvolvimento de metodologia de análise da atividade enzimática para dextranasacase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dextrana: características gerais

A dextrana é um polímero sintetizado extracelularmente pela dextranasacarase, sem que o polissacarídeo penetre no interior da célula. A dextranasacarase é excretada pelo micro-organismo no meio de cultura na presença de sacarose, usando este substrato para a produção da dextrana pela transferência das moléculas de glicose para o sítio receptor do polímero e ao mesmo tempo liberando moléculas de frutose (PADMANABHAN e KIM, 2002; YAMAMOTO, YOSHIKAWA e OKADA, 1993). A sacarose é o único substrato conhecido capaz de induzir a produção enzimática da dextranasacarase.

A dextranasacarase também pode ser produzida por outras bactérias como *Streptococcus* e *Lactobacillus*, mas a cepa mais usada em pesquisas é a *Leuconostoc mesenteroides*, que pode crescer entre 5 e 30°C, sendo que a faixa ótima é de 25 a 30°C (BARKER e AJONGWEN, 1991).

2.2. Dextrana: da descoberta até a produção comercial

Pasteur (1861) descobriu que o aumento da viscosidade e a gelificação dos xaropes de cana de açúcar eram devidas a um micro-organismo. Mais tarde, Scheibler (1874) denominou a substância responsável pelo aumento da viscosidade nos sucos de cana de açúcar e de beterraba, como dextrana, devido à rotação ótica positiva de uma molécula empírica de carboidrato ($C_6H_{10}O_6$). Van Tieghem (1878) isolou o micro-organismo responsável pela produção da dextrana e o denominou *Leuconostoc mesenteroides*, contudo posteriormente descobriu-se que vários outros micro-organismos eram capazes de produzir dextrana.

Hehre, em 1941, provou que era possível produzir dextrana com o caldo fermentado isento de células, em presença de sacarose. Em 1943, Hestrin, Averini-Shapiro e Aschner descobriram que existia uma enzima extracelular que era responsável pela produção da dextrana e a nomearam de dextranasacarase.

Em 1947, uma indústria sueca encarregou Björn Ingelman, jovem cientista da Universidade de Uppsala, de pesquisar uma interessante impureza presente no açúcar de caldo de beterraba. Estudos posteriores mostraram que esta impureza era a Dextrana e que ela era produzida pelo micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* que é capaz de crescer na presença de sacarose contida no caldo de beterraba. Pesquisas intensas foram conduzidas com o objetivo de descobrir aplicações da dextrana na ciência e na medicina. Isto levou à patente do uso da dextrana hidrolisada como expensor do plasma sanguíneo. Esta invenção foi licenciada pela Pharmacia (Stockholm) e logo em seguida, soluções de Dextran 70 foram aprovadas na Suécia para uso em aplicações medicinais.

A Pharmacia (Suécia) se tornou, portanto o maior produtor mundial de dextrana e soluções de dextrana. Outros produtores são: Fisons (Reino Unido), Meito (Japão), Pfeiffer & Langen e UEB Sermwerke (Alemanha) e Polfa (Polônia). Alguns produtores de dextrana clínica são: Pharmacia (EUA e Suécia), Knoll/Schiwa (Alemanha), Abbatt (EUA), Travenol (EUA), Fisons (Reino Unido) (MAUGERI, 2001).

2.3. Dextrana: efeitos negativos

A presença de micro-organismos nas diversas etapas da produção de açúcar causa ainda hoje perdas consideráveis. As bactérias da espécie *Leuconostoc mesenteroides* são contaminantes usuais, tendo merecido especial atenção por estarem relacionadas com a presença de dextrana nos caldos de cana. Além da sacarose consumida na sua síntese, a dextrana provoca aumento da viscosidade do caldo, dificultando etapas de clarificação, filtração e bombeamento. O açúcar contendo alto teor de dextrana é considerado de baixa qualidade. Este açúcar é de difícil cristalização, apresentando também maior higroscopicidade, dificultando a secagem e armazenamento.

2.4. Estrutura da Dextrana

Dextrana é o termo usado pela literatura para descrever uma classe de polissacarídeos formados por unidades α -D-glucopiranosil, contendo em proporções variáveis ligações α -(1,6), α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4). A maioria das dextranas conhecidas tem uma cadeia principal linear, formada por ligações α -(1,6), apresentando diversidades quanto às proporções das outras ligações e das ramificações, sendo sintetizadas a partir da sacarose (SADDFORD, 1979).

O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese. A dextrana nativa apresenta em média massa molar entre 40 e 50 milhões de Dalton nas condições industriais atualmente utilizadas (SABATIE, CHOPLIN et al., 1986).

2.5. Aplicações

Atualmente a dextrana tem sido empregada em diversas áreas devido às suas características não iônicas e boa estabilidade em condições normais de operação. O potencial da dextrana se estende a indústria farmacêutica, química, petroquímica e na indústria de alimentos. Dentre as aplicações que alcançaram sucesso comercial, destacam-se as utilizações na indústria farmacêutica para fins clínicos.

Mais recentemente, as indústrias fotográficas e oftalmológicas têm mostrado grande interesse na demanda de dextrana. Dextranas são também

utilizadas em formulações de cremes e loções; obtendo grande sucesso nas formulações de cremes utilizados em bebês.

Viet, Beck-Candanedo e Gray (2008) estudaram a síntese e caracterização de dextranas azuis de massas molares variadas, as quais são polieletrólitos devido a sua ligação a corantes iônicos, que influencia fortemente suas propriedades em solução aquosa.

Seto, Kawakita *et al.*, (2008) sintetizaram um novo composto polissacarídeo, ceto-dextrana através da oxidação de região-seletiva da sacarose, utilizando a bioconversão com piranose-2-oxidase e da subsequente reação de transferência da sacarose oxidada.

Gil, Colarte *et al.*, (2008) mostraram em seu estudo a caracterização físico-química de uma nova série de dextranas nativas (B110-1-2) obtida de cana-de-açúcar, que apresenta propriedades de inovação quanto ao encapsulamento de comprimidos farmacêuticos, como estabilidade na presença de misturas em pó de algumas substâncias comerciais de encapsulamento como lactose, álcool cetílico e na presença de drogas (hidrocloreto de propanolol, ácido acetil salicílico, dinitrato isossorbato, loperzario dissodico e nifedipina). Essa estabilidade foi demonstrada pela calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os comprimidos obtidos pela compressão mostraram boas propriedades físico-mecânicas e tecnológicas.

Seo, Nam *et al.* (2007) apresentaram um método de síntese de um oligossacarídeo termo-ácido estável (TASO) a partir da ação da dextranasacarase, obtida de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM, sobre solução de sacarose (2,5 – 4,0 M), sendo que o grau de polimerização dos oligossacarídeos sintetizados foi de 2 a 11 (unidades de glicose). Além de inibir efetivamente a formação de glucana insolúvel, o crescimento e a produção ácida de *Streptococcus sobrinus*, o composto TASO pode ser potencialmente utilizado como adoçante em alimentos e bebidas quando propriedades termo-ácido resistentes forem necessárias e, como inibidor da cárie dentária.

Outra área em crescimento que faz uso da dextrana é em imagem de ressonância magnética, sendo que este uso foi recentemente aprovado pelos Estados Unidos e pela Comunidade Européia. Além dessas aplicações, dextrana também vem sendo usada na biologia molecular onde um de seus derivados, a dextrana sulfato, é utilizada em processos de hibridização. A dextrana tem contribuído para a estabilidade de vacinas, auxiliando em bioprocessos industriais

visando melhoramento de técnicas de floculação. Este crescente interesse pela busca de novas áreas de aplicação para as dextranas e seus derivados pode ser parcialmente creditado pelas características que esses homopolissacarídeos apresentam: como hidrofobicidade, estabilidade, pureza e habilidade para formar soluções claras e estáveis, além de serem originários de fontes renováveis e degradados por sistemas ecológicos.

Na indústria farmacêutica: A dextrana de baixa massa molar (< 75000) apresenta duas características importantes para os fins clínicos: é completamente metabolizada no organismo e não apresenta efeitos tóxicos ou alérgicos, os quais aparecem com a dextrana de alta massa molar ou com alto grau de ramificação. As aplicações de maior importância comercial na indústria farmacêutica são as utilizações como expansor de plasma sanguíneo e o uso do complexo Dextrana-ferro.

Já na Indústria de alimentos, a dextrana pode ser usada como agente estabilizante e geleificante, inibe a cristalização (QUEIRÓZ, 1987).

A título de curiosidade: o polímero de Dextrana é o chamado Sephadex (SEparation, PHArmacia DEXtran), que em 1959 teve suas propriedades filtrantes publicadas por Jerker Porath e Per Flodin na Nature (PORATH e FLODIN, 1959), o que gerou imediata aceitação dos bioquímicos de todo o mundo no uso do gel para purificação de moléculas biológicas, sendo que ainda hoje é usado no estudo de estruturas e na função de biomoléculas, especialmente de proteínas. (PHARMACIA.BIOTECH, 1997)

Entre os anos de 1976 e 2010, somente nos Estados Unidos foram patenteados 44.086 estudos sobre dextranas e seus derivados (US Patent, 2010). Na Europa foram registrados 3.926 documentos sobre patentes de dextrana e derivados (EU Patent, 2010).

2.6. Processo de produção convencional e produção por via enzimática

A produção de dextrana pode ocorrer através de dois processos distintos, sendo eles o processo convencional e a produção por via enzimática.

No processo convencional de produção de dextrana, esta é produzida durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo

sacarose, extrato de levedura e outros nutrientes, controlando a temperatura, o pH e a aeração.

A Produção de dextrana por via enzimática é conduzida em duas etapas, produção da enzima e síntese da dextrana. A síntese da dextrana “in vitro” apresenta potencial econômico enorme, devido ao fato de ser extracelular e não necessitar de energia adicional e da reação ser irreversível. Segundo (KABOLI e REILLY, 1980), a enzima bruta e liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada à temperatura abaixo de 5°C. Em solução, vários fatores influenciam a estabilidade da enzima, sendo que a temperatura e o pH são os mais importantes.

2.7. Meio de Cultivo

Para avaliar qual a melhor composição de meio de cultura para a produção de dextranasacarase pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, Contiero, Cortezi *et al.* (2006) relataram fermentações em batelada sem controle de pH, enfocando a influência de 8 diferentes meios de cultura na produção da enzima, a 30°C, 132 rpm, pH 7,4 e 0,5 vvm em reator de 2L contendo 1L de meio. O melhor meio de cultivo com 2% de sacarose, 0,5% extrato levedura, 2% K₂HPO₄, 0,001% NaCl, 0,001% MnSO₄, 0,001% FeSO₄ apresentou atividade enzimática de 5,67 UDS/mL. O pH ao final de 14 horas de cultivo ficou em torno de 4,0-5,0. Foi constatada diminuição na atividade enzimática com o aumento da concentração de sacarose (de 20 g/L para 40 g/L).

2.8. Estabilidade enzimática

Vários autores estudaram condições de estabilidade da enzima dextranasacarase para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (YOKOYAMA, KOBAYASHI e MATSUDA, 1985; KOBAYASHI e MATSUDA, 1980; KOBAYASHI, MIHARA e MATSUDA, 1986; KOEPESELL e TSUCHIYA, 1952; TSUCHIYA, KOEPESELL *et al.*, 1952; RHEE e LEE, 1991; KIM e ROBYT, 1996).

Girard e Legoy (1999) demonstraram em seu trabalho que a enzima dextranasacarase é menos estável na presença de solventes orgânicos a 30°C que em 4°C.

A sensibilidade da dextranasacarase quanto ao pH é bastante grande, apresentando maior estabilidade entre 5,0 e 6,0, coincidindo com a faixa de

atividade enzimática máxima. Para preparações de enzima purificada alguns autores relatam que a faixa de estabilidade pode se alterar ligeiramente. Kobayashi e Matsuda (1980) mostram que a enzima purificada é mais estável em pHs entre 6,0 e 9,0.

2.9. Mecanismos de ação da enzima dextranasacarase

A Dextranasacarase (EC 2.4.1.5) é uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a transferência de resíduos D-glicopiranosil da sacarose para a dextrana, liberando moléculas de frutose (ROBYT, 1985; LEATHERS, 2002).

A atividade catalítica da dextranasacarase é uma combinação de reações envolvendo os sítios ativos da enzima, o substrato e o aceptor. Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana a partir da sacarose: a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira responsável pela quebra da ligação entre a frutose e a glicose da sacarose, formando o grupo D – glicosil e a segunda, a transferência do grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação.

2.10. Cepas utilizadas para produção de dextranasacarase

A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 512 (F) é considerada micro aerófila e autores consideram que possivelmente o oxigênio afeta o crescimento da cepa (BARKER, GANETSOS e AJONGWHEN, 1993).

Dols, Remaud-Simeon e Monsan (1997) realizaram um estudo comparativo da produção de dextranasacarase por duas cepas diferentes de *Leuconostoc mesenteroides*. As duas cepas usadas foram NRRL B 1299 e a mais comumente usada em pesquisas, NRRL B 512. Constataram que a regulação do pH e das condições de aeração teve pequeno efeito sobre a cultura e a produção de dextranasacarase por NRRL B 1299, ao contrário da cepa NRRL B 512, onde essas condições melhoraram significativamente a produção da enzima.

Ui-Qader, Iqbal *et al.* (2001) estudaram a produção de dextranasacarase e dextrana pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-3, utilizando como referência a cepa NRRL B 512 F. Os autores trabalharam com a temperatura de 26°C e pH 7,5, sendo que durante a fermentação o pH decrescia para 5,0. Foi observado que a cepa PCSIR-3 produziu uma dextrana diferente da produzida pela

cepa NRRL B 512 F. Com 18 horas de fermentação e utilizando 2% de sacarose, foi alcançado 0,69 g/100mL de dextrana e concentração celular de 0,544 g/100mL pela cepa PCSIR-3, já para a cepa NRRL B 512 F a produção de dextrana foi de 0,82 g/100mL e a concentração celular de 0,798 g/100mL.

Tabela 2.1 – Relação das linhagens de cada micro-organismo produtor de dextrana e as respectivas referências bibliográficas.

MICRO-ORGANISMO	LINHAGEM	REFERÊNCIA
<i>Lactobacillus reuteri</i>	strain 121	(KRALJ, VAN GEEL-SCHUTTEN et al., 2005)
<i>Leuconostoc citreum</i>	genes HJ-P4 and HJ-P5	(EOM, SEO e HAN, 2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	(RICHARD, MOREL et al., 2003)
		(NEUBAUER, BAUCHE e MOLLET, 2003)
		(ALCALDE, PLOU et al., 1998)
		(CHAGAS, HONORATO et al., 2007)
		(NAESSENS, CERDOBBEL et al., 2005)
		(SETO, KAWAKITA et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-1375	(YOKOYAMA, KOBAYASHI e MATSUDA, 1985)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-512FM	(TANRISEVEN e ROBYT, 1992)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-512FMC	(KITAOKA e ROBYT, 1999)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-512FMCM	(KIM, ROBYT. et al., 2003)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	B-742CB	(PARK, RYU et al., 2001)
		(YOON, BRUCE FULTON e ROBYT, 2004)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Birmingham strain	(BAILEY, BARKER et al., 1957)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	fragment	(MALTEN, HOLLMANN et al., 2005)
		(WANG, HOLLMANN e DECKWER, 2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	gene DSRB742	(NAM, KO et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	genes HJ-S7 and HJ-S13	(EOM, SEO e HAN, 2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	IAM 1046	(SUZUKI e KOBAYASHI, 1975)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	IBT-PQ	(CHELLAPANDIAN, LARIOS et al., 1998)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	mutants constitutive for glucansucrase	(KIM e ROBYT, 1996)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B-1299	(SUZUKI e KOBAYASHI, 1975)
		(KOBAYASHI e MATSUDA, 1975)
		(FABRE, BOZONNET et al., 2005)

<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B-1416	(KOBAYASHI, YOKOYAMA e MATSUDA, 1986)
		(YOKOYAMA, KOBAYASHI e MATSUDA, 1985)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRI B-512(F)	(MILLER, EKLUND e ROBYT, 1986)
		(MILLER e ROBYT, 1986)
		(MILLER e ROBYT, 1986)
		(MICHIELS, WANG et al., 1991)
		(KABOLI e REILLY, 1980)
		(KOBAYASHI e MATSUDA, 1980)
		(KOBAYASHI, MIHARA e MATSUDA, 1986)
		(MONCHOIS, REMAUD-SIMEON et al., 1997)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NRRL B-512F (LOPES, 1979)	(GOYAL e KATYAR, 1998)
		(DE SEGURA, ALCALDE et al., 2004A)
		(RICHARD, YU et al., 2005)
		(GOULAS, FISHER et al., 2004)
		(FUNANE, ISHII et al., 2005)
		(MOULIS, ARCACHE et al., 2006)
		(PURAMA e GOYAL, 2005)
		(MOULIS, JOUCLA et al., 2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	recombinant	(GOYAL, TYAGI e KATYAR, 2007)
		(KNAG, SEO et al., 2003)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sikhae	(RHEE e LEE, 1991)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain 0326, gene dexYG	(ZHANG, HU et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain B-1299	(DE SEGURA, ALCALDE et al., 2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain B-1299CB4, gene dsrBCB4	(KANG, KIM e KIM, 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain B-512F	(ARQUEELLO-MORALES, SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2005)
		(MAJUMDER, PURAMA e GOYAL, 2007)
		(LEE, CHO et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain B-512FMCM	(KIM e DAY, 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain CGMCC 1.544, gene dsrX	(YALIN, JIN et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain FT 045 B	(CONTIERO, CORTEZI et al., 2006)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain Lm 28	(ILIEV, VASSILEVA et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain NRRL B-512F	(BENTRAND, MOREL et al., 2006)
		(NIGAM, GOYAL e

		KATIYAR, 2006)
		(ERHARDT, KUEGLER et al., 2008)
		(MOULIS, MEDINA et al., 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain NRRL B-640	(PURAMA e GOYAL, 2008)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain NRRL B512-F	(SUWANNARANGSEE, MOULIS et al., 2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain PCSIR-4	(UL-QADER, AMAN et al., 2007)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strains IBT-PQ and NRRL B-1299, gene dsrP	(OLVERA, FERNANDEZ-VAZQUEZ et al., 2007)
<i>Penicillium aculeatum</i>	strain ATCC 10409	(ERHARDT, STAMMEN e JOERDENING, 2008)
<i>Streptococcus mutans</i>	-	(ONO, NUESSELE e SMITH, 1981)
		(RUSSEL, 1979)
<i>Streptococcus mutans</i>	6715	(CHLUDZINSKI, GERMAINE e SCHACHTELE, 1974)
<i>Streptococcus mutans</i>	E49	(TAKASHIO e OKAMI, 1983)
<i>Streptococcus mutans</i>	HS6	(FUKUI, FUKUI e MORIYAMA, 1974)
<i>Streptococcus oralis</i>	-	(SEIBEL, HELLMUTH et al., 2006)
<i>Streptococcus oralis</i>	gene gtfR	(HELLMUTH, WITTRICK et al., 2008)
<i>Streptococcus sanguis</i>	-	(GRAHME e MAYER, 1985)
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10558	(HUANG, LEE e MAYER, 1979)

Fonte: (BRENDA- The Comprehensive Enzyme Information System), modificado.

2.11. Aeração

Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria considerada microaerófila. Barker, Ganetsos e Ajongwhan (1993) e Landon e Webb (1990) consideram que o oxigênio afeta positivamente o crescimento da cepa (JOHNSON e MCCLESKEY, 1957; PLIHON, TAILLANDIER e STRE HAIANO, 1995; LEBRUN, JENTER et al., 1994).

Lazic, Veljkovic et al. (1993) mostraram que fermentações utilizando pH controlado em 5,5 e aeração 0,05 vvm são condições favoráveis para produção de dextrana, além de ocorrer redução no tempo de fermentação.

Santos, Teixeira e Rodrigues (2000) estudaram o efeito da aeração na produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides*, a temperatura usada na fermentação foi de 25°C e concentração de sacarose 20g/L. Foi constatado que a aeração de 0,05 vvm não teve efeito importante na produção da

enzima, porém efeito positivo sobre o crescimento. A atividade enzimática foi praticamente a mesma quando comparada aquela sem aeração.

Os experimentos foram realizados com pH inicial 7,0-7,2 (que se reduziram a 4,3 ao final da fermentação), temperatura 25°C e o pré-inóculo foi desenvolvido em frascos sem agitação por 16 horas. Verificou-se que a maior atividade foi alcançada utilizando agitação de 150 rpm e aeração de 0,05 vvm (10 UDS/mL) com 14 h de cultivo.

Foi demonstrado que a produção de dextranasacarase está proximamente relacionada ao crescimento da bactéria. A maior produção de dextranasacarase e seu melhor rendimento são alcançados quando a maior taxa de oxigênio é oferecida ao mesmo tempo em que o máximo de oxigênio é consumido pelo organismo, fase que corresponde ao crescimento exponencial do micro-organismo.

A fermentação da dextrana por *Leuconostoc mesenteroides* foi estudada sob ambas as condições (aeróbica e anaeróbica) com e sem o controle de pH. O máximo rendimento de dextrana foi obtido com o máximo rendimento, estabilidade e atividade da dextranasacarase quando a taxa de transferência de oxigênio no biorreator foi igual ao máximo de oxigênio consumido pelo organismo, quando o pH do meio era de 5,5.

Em condições anaeróbicas, parte de glicose e da frutose obtida pela hidrólise da sacarose, é utilizada pelo organismo como fonte de energia, diminuindo a quantidade de dextrana e de frutose, sendo que o consumo de frutose é sempre maior porque ela serve também como receptora de elétrons para a reoxidação do NADH.

Em níveis de aeração acima do ponto ótimo, a glicose proveniente de sacarose é rapidamente utilizada pelo organismo, fazendo com que a formação de dextrana diminua enquanto a quantidade de frutose não consumida (LAZIC, VELJKOVIC et al., 1993).

Alsop (1983) constatou que o rendimento da enzima dextranasacarase foi maior sob condições de aeração quando comparado sem aeração ou com aeração de oxigênio puro. A regulação do pH e as condições de aeração tiveram pouco efeito no desempenho da cultura e na produção da enzima pela cepa B-1299, quando comparado com outras linhagens. A aeração foi de 0,5 vvm. A fermentação não aerada apresentou a produção mais baixa de dextranasacarase. O melhor

rendimento da enzima foi obtido com a fermentação aerada com atmosfera de N₂. Este experimento também apresentou o menor crescimento de biomassa.

Ajongwen e Barker (1993) estudaram a aeração utilizando diferentes gases indicando que a presença de dióxido de carbono no meio favoreceu a alta produção da enzima.

2.12. Agitação

Koepsell e Tsuchiya (1952) comprovaram que o rendimento da enzima é invariavelmente mais alto quando a fermentação é conduzida em frascos agitados, quando comparados a frascos em repouso, contudo Ajongwen e Barker (1993) demonstraram que as diferentes velocidades de agitação não apresentaram efeitos significantes na concentração celular ou na produção da enzima.

2.13. Uso de Sacarose como substrato

Vários autores têm descrito os efeitos da concentração de sacarose, temperatura e extrato de levedura na produção de dextranasacarase, dextrana e frutose por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) utilizando sacarose como substrato. O efeito da concentração de sacarose na produção de dextranasacarase também é mostrado por Tsuchiya, Koepsell et al., (1952). Esses autores constataram que concentrações maiores que 2 % m/v induzem a melhor produção da enzima, no entanto essas culturas contêm altas quantidades de dextrana, o que dificulta a remoção das células.

Santos, Teixeira e Rodrigues (2000) trabalharam com a temperatura de 25 °C e pH 5,5 variando a concentração de sacarose entre 10 – 120 g/L. A atividade enzimática aumentou com a concentração de sacarose, porém para concentrações acima de 80 g/L houve dificuldade para determinar a atividade, pois parte da enzima e quase toda dextrana e frutose produzidos foram centrifugados juntamente com as células.

Ribeiro, Coutinho Filho e Ceribelli (1998) estudaram a produção de dextranasacarase por fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 em diferentes formulações de meio, a temperatura usada foi 27°C, pH 6,7, aeração 0,5 vvm e agitação 250 rpm. Dentre os meios utilizados o que apresentou melhores resultados em termos de produção de enzima foi aquele contendo melaço (40g/L)

em substituição a sacarose, atingindo atividade de 240 UDS/mL após 7 h de fermentação.

Jeanes (1965) trabalhou com a temperatura de 27°C e adição contínua de sacarose na razão de 20 g/L/h, alcançando a atividade de 180 UDS/mL com 10 horas de fermentação.

Queiróz (1987) trabalhou com pH 7,0 e temperatura 27°C para fermentações com *Leuconostoc mesenteroides*, sendo que a atividade enzimática oscilou entre 15 e 30 UDS/mL. Em condições semelhantes, Lopes (1979) relatou que a atividade enzimática oscilou entre 25 – 50 UDS/mL, enquanto Tsuchiya, Koepsell et al., (1952) relataram atividades pouco maiores trabalhando com 25°C.

O único significado para o decréscimo do rendimento da dextrana e a melhora do rendimento da enzima (UDS/g sacarose consumida) foi a manutenção da concentração de sacarose em níveis baixos na cultura da linhagem B01299. Baixa concentração de sacarose demonstrou ser necessária para a ótima produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Assis, Bilch et al. (2003) mostraram que a concentração de sacarose no meio de fermentação desempenha um papel fundamental na velocidade de síntese da enzima, bem como na sua atividade final. Concentrações iniciais de sacarose da ordem de 15 a 45 g/L, associadas a adição posterior desse carboidrato em períodos de 1 até 3 horas de fermentação com taxa de 0,5 a 0,8 g/min, levou a maior consumo de açúcar e maior atividade enzimática final, da ordem de 146,5 UDS/mL.

Neely e Nott (1962) demonstraram que a dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* é induzida na presença de sacarose. Além disso, os resultados demonstram que a porção frutofuranose da molécula de sacarose é o gatilho que causa a indução do mecanismo. Nenhum outro indutor da dextranasacarase foi encontrado.

Lawford, Kligerman et al. (1979) cultivaram *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F em fermentação contínua sob condições energéticas limitadas. A enzima extracelular dextranasacarase não foi detectada em culturas com sacarose ou maltose limitadas. Sob condições de baixa concentração de sacarose, a atividade enzimática do sobrenadante sem as células, aumentou com o aumento da diluição somente após atingir a concentração ótima de sacarose para indução. O surgimento de frutose no meio com sacarose limitante indicou que a mesma foi desviada para a

produção de dextrana. A competição entre a bactéria e a enzima extracelular pelo substrato comum representa deficiência no sistema produtor de enzima. A dextranasacarase foi isolada da cultura celular pela precipitação com sulfato de amônio e cromatografia DEAE-celulose. A enzima apresentou desta forma, a atividade biossintética da dextrana e a atividade do tipo invertase.

2.14. Relação carbono/nitrogênio

Lopretti e Martinez (1999) estudaram o efeito da razão nitrogênio/ carbono e açúcares complementares na produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512. A temperatura usada durante a fermentação foi 35°C agitação 150 rpm e pH 5,5. Foi verificado que a taxa de produção da enzima decresce com a diminuição da razão nitrogênio/carbono.

Pirollo e contiero (2001) estudaram a razão carbono/nitrogênio na produção da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), trabalhando com a temperatura de 26°C, agitação 132 rpm, aeração 0,5 vvm e pH 6,7. Foi constatado que a razão carbono/nitrogênio igual a 50/20 promoveu a maior produção de biomassa e melhor atividade enzimática em 7 horas de fermentação. Concentrações de sacarose acima de 60g/L inibiram a concentração celular e a produção da enzima.

2.15. Efeito da temperatura na produção de dextranasacarase

Cortezi, Monti e Contiero (2005) estudando diferentes temperaturas (23°C, 25°C, 27°C, 29°C e 31°C) na produção de dextranasacarase utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F). Observaram que a pH 6,0 e aeração 0,5 vvm, a temperatura de 29°C favoreceu maior produção da enzima (53,52 UDS/mL) em 8 horas de fermentação e a temperatura de 31°C promoveu decréscimo na produção da mesma.

Tsuchiya, Koepsell *et al.* (1952) demonstraram que o aumento da temperatura (acima de 25°C) acentua significativamente o efeito do pH sobre a deterioração da enzima. Um experimento que continha sacarose e água de maceração e que foi mantido a pH 6,7 em temperaturas controladas de 20, 23, 26 ou 29 °C, o máximo de atividade enzimática atingido foi de 47, 51, 43 e 6,0 UDS/mL em

12, 9, 7 e 5 h de fermentação, respectivamente. Mesmo que a enzima tenha sido formada a 29 °C, a degradação da mesma explica o baixo rendimento.

Chellapandian, Larios *et al.* (1998) comprovaram o efeito da temperatura na estabilidade da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ. Os autores relataram que a enzima permanece estável a 30°C, desnaturando a 40°C, e nesta temperatura mantém somente 11% da atividade original.

Cortezi, Monti e Contiero (2005) estudaram o efeito da temperatura (23, 25, 27, 29, 31 °C) na produção da enzima dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, empregando 132 rpm, 0,5 vvm, pH 6,0 (controle de pH utilizando NaOH 2M) e 2L de volume de meio, durante 8 horas de fermentação em reator de 5L. As melhores temperaturas para a produção da enzima foram 23 e 25 °C (3,2 UDS/mL) com 8 horas de fermentação.

A produção da enzima dextranasacarase diminuiu com o aumento da temperatura, enquanto que a concentração celular aumentou com a temperatura até 29°C, decrescendo quando da utilização da temperatura de 31°C.

2.16. Efeito do pH na produção de dextranasacarase

Santos, Teixeira e Rodrigues (2000) verificaram o efeito do pH na produção da enzima, constatando que pH 6,7 favorece o crescimento da cepa, porém a atividade enzimática é maior em pH 5,5. Em pH 4,0 o crescimento da cepa não ocorre e a pH 5,0 o crescimento da cepa é similar aquele obtido com pH 5,5, com atividade enzimática decrescendo em 30%. Os autores observaram ainda, que o crescimento é similar nas temperaturas entre 20 – 30 °C, sendo significativamente maior à 35°C. À 40 °C não foi observado crescimento da cepa.

Veljkovic, Lazic *et al.* (1992) mostraram que o pH do meio de cultura, inicialmente a 7,0 decrescia para 4,2 ou 4,3, mas que a melhor faixa para o crescimento era de 6,0 a 6,9.

Lazic, Veljkovic *et al.* (1993) demonstraram que a produção de dextrana depende do pH em que se está realizando a fermentação e que esta produção é maior a pH 5,5 que a pH 6,7 ou quando o pH não é controlado. Isto pode ocorrer devido ao fato da enzima dextranasacarase ser mais ativa e estável a pH 5,5. Em pH 6,7 o organismo utiliza tanto a glicose quanto a frutose, diminuindo a quantidade de dextrana e de frutose. O mesmo efeito é esperado em valores maiores de pH no

início da fermentação sem controle de pH. Em pH 5,5 a sacarose é eficientemente convertida em dextrana pela dextranasacarase nas primeiras fases da fermentação. Foi realizada a fermentação com controle de pH a 6,7 e a 5,5, apresentando os mesmos resultados. Descobriu-se que a pH 5,5 e aeração a 0,05 vvm a produção da dextrana é favorecida e o tempo de fermentação é diminuído.

Tsuchiya, Koepsell *et al.* (1952) realizaram fermentação sem controle de pH, iniciando com pH 7,0 e embora houvesse alta concentração de tampão fosfato, o pH decresceu de 7,0 para 5,0 em 17 horas de fermentação. A maior produção da enzima ocorreu quando o pH atingiu 6,9 e continuou até pH 6,0. Realizaram-se, também experimentos com controle de pH, sendo que foram testadas fermentações com pH de 6,1; 6,3; 6,7 e $7,0 \pm 0,1$. O máximo rendimento ocorreu em pH 6,7. O pH do meio de cultura, inicialmente a 7,0 decresce para 4,2 ou 4,3. A melhor faixa de pH para o crescimento é de 6,0 a 6,9.

A dextranasacarase é mais estável e mais ativa na faixa de pH de 5,0 a 5,5. A enzima responsável pela síntese da dextrana, a dextrana-sacarase, é uma enzima extracelular induzida, ou seja, é necessária a presença da sacarose como substrato para induzir a sua produção.

Fermentações foram realizadas por Lazic, Veljkovic *et al.* (1991) com o pH controlado em 6,7 e 5,5 apresentando resultados similares. Eles descobriram que pH 5,5 e 0,05 vvm de aeração são condições favoráveis para a produção de dextrana e redução do tempo de fermentação.

Para avaliar o efeito do pH (5,0) na produção da enzima, Cortezi, Monti e Contiero (2005) utilizaram em suas fermentações 30°C, 132 rpm, 0,5 vvm e volume de meio de 2L, durante 8h de fermentação e considerando que nos experimentos conduzidos sem controle de pH, as máximas atividades enzimáticas observadas ocorreram quando o pH estava em torno de 5,0, optou-se por realizar uma fermentação com controle de pH em 5,0, porém constatou-se que com o pH controlado neste valor, houve efeito negativo tanto no crescimento do micro-organismo, como na produção da enzima. Em algumas fermentações, o aumento da produção de dextranasacarase é proporcional ao crescimento da cepa, pH do meio controlado em 5,0 pode ter inibido a concentração celular, levando então a baixa produção enzimática; outro fato que pode ter ocasionado este resultado é que em meio ácido a enzima sofreu desnaturação, impedindo seu acúmulo no meio de cultura.

Dols, Remaud-Simeon e Monsan (1997) mostraram que a regulação do pH e as condições de aeração tiveram pouco efeito no desempenho da cultura e na produção da enzima pela cepa B-1299 quando comparado com outras linhagens. O pH foi ajustado a 6,9 com ácido ortofosfórico e mantido a 6,7 com NaOH 4N. A dextranasacarase da linhagem B-512F é mais sensível à inibição por pH que a enzima da linhagem B-1299, portanto a regulação do pH a 6,7 (o pH mais compatível como crescimento e com a estabilidade da enzima) diminui o rendimento da dextrana e dobra o a produção de enzima por quantidade de sacarose consumida. As culturas da linhagem B-1299 não tiveram seu perfil modificado pela regulação do pH a 6,7, contudo a produção da dextranasacarase é controlada pela fisiologia das células quando elas consomem sacarose.

2.17. Análise da Atividade Enzimática da Dextranasacarase

Um método comumente utilizado para a determinação da atividade enzimática da dextranasacarase foi a medição periódica do valor redutor do meio reacional, resultante do aumento da D-frutose a partir da quebra da sacarose, quando a metade glicosídica é incorporada à molécula de dextrana (MILLER, 1959; LOPEZ e MONSAN, 1980; MARTINEZ-ESPINDOLA e LOPEZ-MUNGUIA, 1985; SABATIE, CHOPLIN et al., 1986).

Estes estudos foram realizados utilizando os métodos alcalinos de cobre descritos por Shaffer e Somogyi (1933) e Nelson (1944). Miller (1959) introduziu o método alcalino 3,5-dinitrosalicilato para determinação dos valores redutores dos carboidratos, e em 1980, Lopez e Monsan (1980) introduziram o método de determinação dos valores redutores usando o reagente alcalino 3,5-dinitrosalicilato (DNS) para a determinação da atividade enzimática da dextranasacarase. Outros autores têm usado o método alcalino DNS para analisar a atividade da dextranasacarase e enzimas relacionadas desde 1980 até os dias atuais (JEANES, HAYNES et al., 1954; TSUCHIYA, HELLMAN et al., 1955; ITAYA e YAMAMOTO, 1975; NELSON, 1944; MILLER, 1959; LOPEZ e MONSAN, 1980; MARTINEZ-ESPINDOLA e LOPEZ-MUNGUIA, 1985; SABATIE, CHOPLIN et al., 1986; MONSON, PAUL et al., 1987; VALDIVIA, MONSAN et al., 1987; OTTS e DAY, 1988; WILLEMONT, MONSAN e DURAND, 1988; LOPEZ-MUNGUIA, PELENC et al., 1990; PRADINES, KLAEBE et al., 1991; REMAUD, PAUL et al., 1992; LOPEZ-MUNGUIA, PELENC et al., 1993; REMAUD-SIMEON, LOPEZ-MUNGUIA et al.,

1994; DOLS, REMAUD-SIMEON e MONSAN, 1997; RAEMAEKERS e VANDAMME, 1997; GOYAL e KATIYAR, 1997; MONCHOIS, REVERTE et al., 1998; DOLS, REMAUD-SIMEON et al., 1998; QUIRASCO, LOPEZ-MUNGUIA et al., 1999; DOLS, REMAUD-SIMEON et al., 1999; GIRARD e LEGOY, 1999; DOLS-LAFARGUE, WILLEMOT et al., 2001; BOZONNET, DOLS-LAFFARGUE et al., 2002; DE SEGURA, ALCALDE et al., 2003; DE SEGURA, ALCALDE et al., 2004B; KUBIC, SIKORA e BIELECKI, 2004; FABRE, BOZONNET et al., 2005; MOULIS, JOUCLA et al., 2006; MOULIS, MEDINA et al., 2008; CHAMPION, ANDRÉ et al., 2009).

O método que utiliza papel de filtro, usando marcadores radioativos (^{14}C) como substratos foi originalmente descritos por Bullum (1959) para determinação da síntese do DNA. Este método foi adaptado por Thomas, Schlenker e Larner (1968) para a análise da UDPGlc glicogênio sintase [EC 2.4.1.11]. Germaine, Chludzinski e Schachtele (1974) adaptaram o método para análise da atividade da dextranasacarase e outras enzimas relacionadas, envolvendo ^{14}C -sacarose. Tal método tem sido utilizado por Robyt e seus colegas de trabalho (CÔTÉ e ROBYT, 1982; MILLER e ROBYT, 1984; FU e ROBYT, 1990; TANRISEVEN e ROBYT, 1992; KIM e ROBYT, 1994; KIM e ROBYT, 1994; KITAOKA e ROBYT, 1998; MUKERJEA, KIM e ROBYT, 1996).

2.18. Estrutura da dextrana

A dextrana é um homopolissacarídeo extracelular (SIDEBOTHAM, 1974; MONSAN, BOZONNET et al., 2001) de D-glicose composto predominantemente de (ao menos 50%) ligações α -(1,6) na cadeia principal (DOLS, REMAUD-SIMEON et al., 1998; BUCHHOLZ e MONSAN, 2001; SEYMOUR e KNAPP, 1980).

Os diferentes tipos de α -D-glucanas apresentam ramificações principalmente α -(1,3) e ocasionalmente α -(1,4) ou α -(1,2). A estrutura exata de cada tipo de dextrana e da quantidade de ramificações depende da linhagem produtora e, portanto da dextranasacarase(s) envolvida(s) (SEYMOUR e KNAPP, 1980; JEANES, HAYNES et al., 1954).

A produção da dextrana é influenciada por vários fatores. Propriedades físicas e químicas tais como solubilidade, viscosidade, rotação específica, conteúdo de nitrogênio e fosforo podem variar dependendo dos diferentes tipos de micro-organismos usados na sua produção (JEANES, 1965; JEANES, HAYNES et al., 1954). Uma enzima simples pode catalisar a síntese de inúmeros tipos de ligações

na dextrana, permitindo desta forma, a formação de polímeros ramificados (NEELY e NOTT, 1962; SMITH, SAHNLEY e GOODMAN, 1994). Por outro lado, certas linhagens de bactérias têm produzido dextranas de várias estruturas, o que mostra a produção de diferentes dextranasacarases pelo mesmo micro-organismo. (CÔTÉ e ROBYT, 1982; FIGURES e EDWARDS, 1981; ZAHLEY e SMITH, 1995). Em outras palavras, cada dextrana tem sua estrutura definida por uma dextranasacarase definida (JEANES, HAYNES et al., 1954).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo comparativo de 11 diferentes métodos para Análise da Atividade da Dextranasacarase e enzimas relacionadas

3.1.1. Método (I) de precipitação /¹⁴C-Sacarose

Este procedimento foi baseado no procedimento descrito por Germaine, Schachtele e Chludzinski (1974).

A reação enzimática foi preparada pela adição de 75 µL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 167 µL 300mM ¹⁴C-sacarose, pré-aquecido a 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 8µL de dextranasacarase e foi incubada à 30 °C.

Alíquotas de 50 µL da mistura reacional foram retiradas a cada 5 minutos e adicionadas a 100 µL de etanol, misturado e centrifugado por 15 minutos a 13300 g, usando tubo de centrífuga de 0,75 mL de volume. O sobrenadante foi descartado e a dextrana precipitada foi dissolvida a 90 °C e 50 µL de água.

Após a completa solubilização, a solução foi resfriada em gelo por 5 minutos. A dextrana foi precipitada novamente com a adição de 100 µL de etanol, agitada e centrifugada por 15 minutos a 13300 g. A solubilização e a precipitação foram repetidas mais uma vez.

A dextrana precipitada foi tratada com 500 µL de etanol, 500 µL de acetona e 500 µL de etanol, sucessivamente, centrifugando após cada tratamento e então seco sob o calor de uma lâmpada vermelha por 10 minutos.

A dextrana seca foi dissolvida em 500 µL de água e uma alíquota de 50 µL foi adicionada em papel Whatman 3MM de 15x15 mm. Os papeis foram secos sob o calor de lâmpada vermelha por 20 minutos e então inseridos no interior de vial

contendo 10 mL de coquetel tolueno. Cada vial foi medido durante 7 minutos usando espectrômetro de cintilação.

3.1.2. Método (II) ^{14}C -Sacarose

Este procedimento foi desenvolvido como descrito previamente por Germaine, Schachtele e Chludzinski (1974).

A reação enzimática foi preparada pela adição de 75 μL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 167 μL 300mM sacarose, e pré-aquecido à 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 8 μL de dextranasacarase e foi incubada à 30 °C.

Alíquotas de 15 μL da mistura reacional foram coletadas a cada 5 minutos e adicionadas em papel Whatman 3MM de 15x15 mm e imediatamente lavados em metanol com agitação para fixar o polissacarídeo produzido e para eliminar a sacarose que não reagiu e a frutose que foi liberada pela reação enzimática. Os papéis foram agitados em metanol por 20 minutos e lavados 2 vezes mais com 150 mL de metanol por 5 minutos cada vez.

Os papéis foram secos sob o calor de lâmpada vermelha e introduzidos no interior de vial contendo 10 mL de coquetel tolueno. Cada vial foi analisado no espectrômetro de cintilação por 7 minutos.

3.1.3. Método (III) Gravimétrico

A reação enzimática foi preparada pela adição de 1880 μL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 2000 μL 400mM sacarose pré-aquecido à 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 120 μL de dextranasacarase incubada a 30 °C.

Alíquotas de 500 μL da mistura reacional foram retiradas em determinados períodos de tempo e adicionadas a 1000 μL de etanol, misturadas e centrifugadas por 15 minutos a 13300 g, usando tubo de centrífuga de 1,5 mL de volume. O sobrenadante foi descartado e a dextrana precipitada foi dissolvida a ~90 °C e 500 μL de água.

Após a completa solubilização, a solução foi resfriada em gelo por 5 minutos. A dextrana foi precipitada novamente com a adição de 1000 μL de etanol, agitada e centrifugada por 15 minutos a 13300 g. A solubilização e a precipitação foram repetidas mais uma vez.

A dextrana precipitada foi tratada com 1000 µL de etanol, 1000 µL de acetona e 1000 µL de etanol, sucessivamente, centrifugando após cada tratamento e então seca sob o calor de lâmpada vermelha por 20 minutos. A dextrana seca foi pesada.

3.1.4. Método (IV) Medição da dextrana em CCD por densitometria quantitativa

Este procedimento foi baseado no método descrito por Robyt e Mukerjea (1994).

Curva padrão de Dextrana (10-100 ng/mL de dextrana)

A solução concentrada de dextrana foi preparada pela dissolução de 0,2g de dextrana em 100 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 2,5; 6,5; 15,0 e 25,0 µL foram transferidas para outro tubo de ensaio e o volume completado para 500 µL com água. Uma segunda alíquota de 100 µL de cada solução foi adicionada em 900 µL de água, para obter diluição de 10 vezes.

Uma alíquota de 10 µL de cada solução (já diluída 10 vezes) foi aplicada à 15 mm da base da placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Whatman 6K), com micro seringa Hamilton 25- µL). O ponto da aplicação da amostra foi mantido entre 2 e 3 mm pela adição de 1 µL de cada vez, com secagens nos intervalos. A placa foi irrigada até o topo a 20-22°C, usando acetonitrila/água 85:15 (v/v) em duas ascensões.

Após a separação, os carboidratos foram visualizados pelo mergulho da placa de CCD em uma solução de etanol contendo α -naphthol 0,5% (w/v) e 5% (v/v) de H₂SO₄. Após secar a placa naturalmente, ela foi colocada em forno por 10 minutos a 120°C. As bandas dos carboidratos foram medidas usando Densitometro de Imagem (Bio-Rad densitometer, Model GS-670).

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 1880 µL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 2000 µL 400mM sacarose, e pré-aquecido a 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 120µL de dextranasacarase e foi incubada a 30 °C.

Alíquotas de 500 μL da mistura reacional foram retiradas em determinados períodos de tempo e adicionadas a 50 μL de NaOH 3M para interromper a reação enzimática.

Uma alíquota de 25 μL da solução da reação foi diluída 40 vezes pela adição de 975 μL de água, e diluída de novo 25 vezes pela adição de 40 μL em 960 μL de água.

10 μL de cada solução foram analisados em placa de CCD (Whatman 6K), seguindo o mesmo procedimento descrito para a curva padrão de dextrana.

3.1.5. Método (V) Medição de frutose em CCD por densitometria quantitativa

Este procedimento foi baseado no método descrito por Robyt e Mukerjea (1994).

Curva padrão de Frutose (60-2000 ng/mL de frutose)

A solução concentrada de frutose foi preparada pela dissolução de 0,2g de frutose em 100 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 15, 25, 65, 150, 250, 350, 450, 500 μL foram transferidas para outro tubo de ensaio e o volume completado para 500 μL com água. Uma segunda alíquota de 100 μL de cada solução foi adicionada em 900 μL de água, para obter diluição de 10 vezes.

Uma alíquota de 1 μL de cada solução (já diluída 10 vezes) foi aplicada a 15 mm da base da placa de CCD (Whatman 6K) com micro seringa Hamilton 25- μL). O ponto da aplicação da amostra foi mantido entre 2 e 3 mm pela adição de 1 μL de cada vez, com secagens nos intervalos. A placa foi irrigada até o topo a 20-22°C, usando acetonitrila/água 85:15 (v/v) em três ascensões e acetonitrila/água 95:5 (v/v) uma vez.

Após a separação, os carboidratos foram visualizados pelo mergulho da placa de CCD em uma solução de etanol contendo α -naphthol 0,5% (w/v) e 5% (v/v) de H_2SO_4 . Após secar a placa naturalmente, ela foi colocada em forno por 10 minutos a 120°C. As bandas dos carboidratos foram medidas usando um Densitometro de Imagem (Bio-Rad densitometer, Model GS-670).

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 470 μL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 500 μL 400mM sacarose pré-aquecido a 30 °C

por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 30 µL de dextranasacarase e foi incubada a 30 °C.

Alíquotas de 200 µL da mistura reacional foram retiradas em determinados períodos de tempo, adicionadas a 600 µL de etanol, agitadas e centrifugadas por 15 minutos a 13300 g usando um tubo de centrífuga de 1,5 mL.

Uma alíquota de 100 µL da solução da reação foi diluída 10 vezes pela adição de 900 µL de água. 1 µL de cada solução foi analisada em placa de CCD (Whatman 6K), seguindo o mesmo procedimento descrito para a curva padrão de dextrana.

3.1.6. Método (VI) DNS coletando amostras diretamente do meio reacional

Este procedimento foi baseado como descrito previamente por Miller, (1959).

Curva padrão de Frutose (0,5-5,0 µmol/mL)

A solução concentrada de frutose foi preparada pela dissolução de 0,05g de frutose em 10 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 10, 30, 50, 70 e 90 µL foram transferidas para novo tubo de ensaio e o volume completado para 500 µL com água.

Uma alíquota de 50 µL de cada solução foi adicionada a 50 µL de DNS e colocada em água fervente por 5 minutos. Após resfriada imediatamente em gelo, 30 µL da solução foram adicionados a 100 µL de água, colocados nos poços de uma micro placa de leitura e a absorbância foi medida em 540 nm.

O ELX 800 Universal Microplate Reader (Bio-Teck Instruments, Inc.), com filtros de interferência, foi usado para medir a absorbância de cada solução de frutose contida na micro placa de leitura. O branco foi obtido com os reagentes, o mesmo volume de água no lugar da solução de frutose e analisado da mesma forma que as soluções.

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 117 µL de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 125 µL 400mM sacarose, e pré-aquecido a 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 8 µL de dextranasacarase e foi incubada a 30 °C. Alíquotas de 50 µL da reação foram

retiradas do meio reacional a cada 5 minutos, durante 20 minutos e adicionadas diretamente em 50 μ L de DNS e fervidas por 5 minutos. Após resfriadas em gelo, as amostras foram diluídas 60 vezes pela adição de 50 μ L em 100 μ L de água e então pela adição de 50 μ L em 950 μ L de água.

Alíquotas de 30 μ L das amostras diluídas foram adicionadas a 100 μ L de água e inseridas nos poços da micro placa de leitura, onde a absorbância foi obtida a 540 nm.

3.1.7. Método (VII) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) usando DNS

Este procedimento foi baseado como descrito previamente por Miller, (1959).

Curva padrão de Frutose (0,5-5,0 μ mol/mL)

A solução concentrada de frutose foi preparada pela dissolução de 0,05g de frutose em 10 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 10, 30, 50, 70 e 90 μ L foram transferidas para tubo de ensaio e o volume completado para 500 μ L com água.

Uma alíquota de 50 μ L de cada solução foi adicionada a 50 μ L de DNS e fervida em banho-maria por 5 minutos. Após resfriada imediatamente em gelo, 30 μ L foram adicionados a 100 μ L de água, colocados nos poços de micro placa de leitura e a absorbância foi medida em 540 nm.

O ELX 800 Universal Microplate Reader (Bio-Teck Instruments, Inc.), com filtros de interferência, foi usado para medir a absorbância de cada solução de frutose contida na micro placa de leitura. O branco foi obtido com os reagentes, o mesmo volume de água no lugar da solução de frutose e analisado da mesma forma que as soluções.

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 117 μ L de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 125 μ L 400mM sacarose, e pré-aquecida a 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 8 μ L de dextranasacarase e foi incubada à 30 °C. Alíquotas de 50 μ L da reação foram retiradas do meio reacional à cada 5 minutos, durante 20 minutos e adicionadas

diretamente em 100 μ L de etanol, homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 13300 g.

Uma alíquota de 50 μ L do sobrenadante (já diluído 3 vezes com 2 volumes de etanol) foi diluída mais 20 vezes pela adição de 950 μ L de água.

Uma alíquota de 50 μ L de cada solução diluída foi adicionada a 50 μ L de DNS e fervida por 5 minutos. Após o resfriamento em gelo, 30 μ L foram misturados com 100 μ L de água e adicionados aos poços de uma micro placa de leitura, onde as absorbâncias foram obtidas à 540 nm.

3.1.8. Método (VIII) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) por Cu-bicincroninato de cobre

Este procedimento foi baseado como descrito previamente por Fox e Robyt (1991).

Curva padrão de Frutose (6-50 nmol/mL)

A solução concentrada de frutose foi preparada pela dissolução de 0,05g de frutose em 10 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 10, 30, 50, 70 e 90 μ L foram transferidas para um novo tubo de ensaio e o volume completado para 500 μ L com água. Todas as soluções foram diluídas 100 vezes, pela adição de 15 μ L em 1485 μ L de água.

O procedimento consistiu na adição de 100 μ L de cada solução de frutose a 100 μ L do reagente de trabalho, nos poços de micro placa de leitura. A placa foi coberta com filme plástico Saran, homogeneizada usando adaptador de Vortex e incubada em banho-maria por 35 minutos a 80°C. A micro placa foi então resfriada por 15 minutos e a medição da absorbância medida a 570 nm.

O ELX 800 Universal Microplate Reader (Bio-Teck Instruments, Inc.), com filtros de interferência, foi usado para medir a absorbância de cada solução de frutose contida na micro placa de leitura. O branco foi obtido com os reagentes, o mesmo volume de água no lugar da solução de frutose e analisado da mesma forma que as soluções.

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 470 μ L de solução (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) em 500 μ L 400mM sacarose, e pré-aquecido a 30

°C por 5 minutos. A reação enzimática começou com a adição de 30µL de dextranasacarase e foi incubada a 30 °C. Alíquotas de 200 µL da reação foram retiradas do meio reacional a cada 5 minutos, durante 20 minutos e adicionadas diretamente em 600 µL de etanol, homogenizadas e centrifugadas por 15 minutos à 13300 g.

Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante (já diluído 3 vezes com 2 volumes de etanol) foi diluída mais 6,25 vezes pela adição de 420 µL de água, e diluída novamente, mais duas vezes, pela adição de 500 µL em 500 µL de água. E pela última vez pela adição de 30 µL em 970 µL de água. (fator total de diluição = 1250)

Após todas as diluições, as amostras foram analisadas da mesma forma que a curva padrão.

3.1.9. Método (IX) Precipitação da dextrana, seguido da medição dos açúcares redutores (considerados como frutose) por ferricianeto + arsenomolibdato alcalino.

Este procedimento foi baseado como descrito previamente por Ting (1956).

Curva padrão de Frutose (0,3-3,0 µmol/mL)

A solução concentrada de frutose foi preparada pela dissolução de 0,0545 g de frutose em 10 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL foram transferidas para novo tubo de ensaio e o volume completado para 500 µL com água

O procedimento consistiu na adição de 100 µL de cada solução de frutose à 50 µL do reagente de ferricianeto e aquecido a 55°C por 30 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados rapidamente em água corrente e a solução foi parcialmente neutralizada com 100 µL de ácido sulfúrico 2N.

Os tubos foram agitados até não desprender mais gases e 40 µL da solução de arsenomolibdato foram adicionados. Os tubos foram então homogeneizados, e 90 µL de cada solução foram adicionados a 90 µL de água e adicionados aos poços de microplaca de leitura para medição da absorbância a 515 nm.

O ELX 800 Universal Microplate Reader (Bio-Teck Instruments, Inc.), com filtros de interferência, foi usado para medir a absorbância de cada solução de frutose contida na micro placa de leitura. O branco foi obtido com os reagentes, o mesmo volume de água no lugar da solução de frutose e analisado da mesma forma que as soluções.

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 1880 µL de solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,20 à 2000 µL de sacarose 400 mM, e pré-aquecidos a 30°C por 5 minutos. A reação enzimática teve início pela adição de 120 µL de dextranasacarase. A mistura reacional foi então incubado a 30°C. Alíquotas de 500 µL da mistura reacional foram retiradas à cada 5 minutos, durante 30 minutos, e adicionados a 1000 µL de etanol, homogeneizados e centrifugados por 15 minutos à 13300 g usando tubo de centrífuga de 1,5 mL de volume.

Diluição das amostras

Uma alíquota de 15 µL do sobrenadante (já diluído 3 vezes pela adição de 2 volumes de etanol) foi diluído mais 100 vezes pela adição de 1485 µL de água. Todas as amostras foram analisadas da mesma forma que a curva padrão de frutose.

3.1.10. Método (X) Medição direta da fructose e da glucose na reação de digestão por D-frutose e D-glicose Megazyme Kit

Este procedimento foi conduzido como descrito no manual (Procedimentos de análise Megazyme, D-frutose e D-glicose, K-FRU 11/05) disponível no site [www. Megazyme.com](http://www.Megazyme.com).

A reação enzimática foi preparada pela adição de 470 µL de solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) à 500 µL de sacarose 400 mM, e pré-aquecidos a 30 °C5 por 5 minutos. A reação enzimática teve início com a adição de 30 µL de dextranasacarase, e foi incubada a 30°C. Alíquotas de 200 µL da mistura reacional foram retiradas a cada 5 minutos, durante 20 minutos, e adicionados a 10 µL de solução Carrez I e 10 µL de solução Carrez II, para que a reação parasse.

Uma alíquota de 11 µL do sobrenadante (já diluído 1,1 vezes pelas soluções de Carrez I e II) foi diluída novamente pela adição de 989 µL de água (fator

total de diluição = 100). A solução diluída foi analisada pelo kit Megazyme D-glicose e D-frutose (©Megazyme International Ireland Limited 2005, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland).

3.1.11. Método (XI) de análise da dextrana, precipitada 3 vezes e seca, por fenol-ácido sulfúrico para determinação dos carboidratos totais.

Este procedimento foi conduzido como descrito previamente por Fox e Robyt (1991).

Curva padrão de glicose (0,2-1,6 $\mu\text{mol/mL}$ de glicose)

A solução de glicose concentrada foi preparada pela dissolução de 0,0142g de glicose em 10 mL de água usando frasco volumétrico. Alíquotas de 10, 50, 75 e 100 μL foram retiradas e o volume completado para 500 μL com água.

O procedimento consistiu na adição de 25 μL de cada solução e 25 μL de fenol 5% (m/v) aos poços de micro placa de leitura. A placa foi homogeneizada à velocidade baixa em agitador Vortex adaptado durante 30 segundos. A placa foi então colocada em banho de gelo e 125 μL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado a cada poço da micro placa, que contivesse amostra e fenol. A placa foi homogeneizada novamente a baixa velocidade por 30 segundos, incubada em banho de água a 80°C por 30 minutos e resfriada. A absorbância a 492nm foi medida.

Um leitor de micro placas ELX 800 Universal (Bio-Teck Instruments, Inc.), foi usado para medir a absorbância de cada solução de glicose. O branco foi obtido com a mesma reação, utilizando água no lugar das soluções de glicose. Cada solução foi lida em triplicata.

Amostras

A reação enzimática foi preparada pela adição de 1880 μL de solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) à 2000 μL de sacarose 400 mM, e pré-aquecidos a 30 °C por 5 minutos. A reação enzimática teve início com a adição de 120 μL de dextranasacarase, e foi incubada a 30°C. Alíquotas de 500 μL da mistura reacional foram retiradas a cada 5 minutos, durante 20 minutos, e adicionados à 1000 μL de etanol, homogeneizados e centrifugados por 15 minutos à 13300 g. O

sobrenadante foi descartado e a dextrana precipitada foi dissolvida a -90°C em 500 μL de água.

Após completa solubilização, a solução foi resfriada em gelo por 5 minutos. A dextrana foi precipitada novamente pela adição de 1000 μL de etanol, agitada e centrifugada por 15 minutos à 13300 g. A solubilização e a precipitação foram repetidas mais uma vez.

A dextrana precipitada foi tratada com 1000 μL de etanol, 1000 μL acetona e 1000 μL etanol sucessivamente, centrifugando após cada tratamento e então seca sob o calor de uma lâmpada vermelha por 10 minutos.

A dextrana precipitada foi dissolvida à -90°C em 500 μL . Após completa dissolução, 20 μL de cada amostra foram diluídos 75 vezes pela adição de 1480 μL de água. As amostras diluídas foram analisadas assim como a curva padrão de glicose.

3.1.12. Determinação dos terminais redutores de maltodextrinas

Uma série de soluções de maltodextrinas (maltose até maltohexose) na mesma base molar (8 $\mu\text{mol/mL}$) foi preparada. O valor redutor (μg maltose/ mL) foi medido para cada solução, usando três diferentes métodos (Ferricianeto / arsenomolibdato alcalinos, DNS e bicinroninato de cobre) calibrados com curvas padrão de maltose.

Um gráfico dos valores redutores obtidos versus o grau de polimerização (GP) foi preparado para cada maltodextrina.

3.2. Caracterização da nova dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

3.2.1. Organismo

Leuconostoc mesenteroides FT 045 B foi isolada de usina de açúcar e álcool pela Divisão de Controle Microbiológico de Processo Industrial da Fermentec (Brasil).

3.2.2. Enzimas

(a) *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranasacarase (portanto B-512FMC dextransucrase) foi obtida do mutante constitutivo *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC (Kim & Robyt, 1994a; Kim & Robyt, 1994b). O

sobrenadante da cultura foi concentrado e dializado em tampão piridina acetato (pH 5,2) através de cartucho “hollow fiber” (10 cm x 1m, H5P100-43, Amicon, Inc., Beverly, MA) (KITAOKA e ROBYT, 1998). A atividade da dextranasacarase B512FMC foi de 89 IU/mL pelo método ^{14}C -sacarose, no qual 1.0 IU = 1,0 μmol de D-glicose incorporada na dextrana por minuto;

(b) *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranasacarase (portanto FT045B dextranasacarase) foi obtida a partir da *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. O meio de crescimento para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B foi composto por sacarose (40 g/L), extrato de levedura (20 g/L), K_2HPO_4 (20 g/L), CaCl_2 (0,02 g/L), MgSO_4 (0,2 g/L), NaCl (0,01 g/L), FeSO_4 (0,01 g/L) and MnSO_4 (0,01 g/L). Esta linhagem foi estocada à -20°C em soluções criogênicas até a preparação do inoculo (5% v/v) para a fermentação. O micro-organismo foi transferido a partir da cultura estoque para meio similar e foi incubado a 25°C por 18h. O meio de cultura foi centrifugado por 30 minutos à 13.300g pelo método ^{14}C -sacarose, no qual 1,0 IU = 1,0 μmol de D-glicose incorporada na dextrana por minuto;

(c) A Dextranase de *Penicillium* sp foi obtida da Sigma (pó liofilizado, 10-25 unidades/mg sólidas, uma unidade libera 1,0 μmol de isomaltose (quantificado como maltose) por minuto em pH 6,0 a 37°C , usando dextrana como substrato. O pó foi dissolvido em solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,5) para obtenção de 5 IU/mL.

3.2.3. Dextrana referência

Dextrana B512F adquirido da Sigma Company.

3.2.4. Produção de Dextrana

A reação enzimática foi preparada pela adição de 40 mL de solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) a 50 mL de solução sacarose 400 mM e aquecimento a 30°C por 10 minutos. A reação enzimática teve início pela adição de 10 mL da enzima dextranasacarase (2 UI/mL) produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B a 30°C por 33 horas (2 períodos de conversão). No final do tempo reacional, 200 mL de etanol gelado foi adicionado à reação para precipitar a dextrana produzida, sendo posteriormente mantida a 4°C por 24 horas.

A dextrana precipitada foi centrifugada a 13300 g por 30 minutos e dissolvidas em água. Após completa solubilização, a solução foi resfriada em gelo por 10 minutos. A dextrana foi precipitada novamente pela adição de 200 mL de etanol, agitada e centrifugada por 30 minutos a 13300 g. A solubilização e a precipitação foram repetidas mais uma vez para garantir que não havia frutose nem sacarose presentes. A dextrana foi tratada de cinco a sete vezes com acetona e uma vez com etanol anidro e seca em forno à vácuo a 40 °C por 18 horas.

3.2.5. A massa molar media e o grau de polimerização

A massa molar media e o grau de polimerização (DPn) (JANE e ROBYT, 1984) da dextrana foi determinada pela medição do valor de redução usando o método bicinroninato de cobre e a quantificação dos carboidratos pelo método fenol-ácido sulfúrico (FOX e ROBYT, 1991). Grau de polimerização = DPn = $[(\text{carboidratos totais em } \mu\text{g de D-glicose}) \div (\text{valor redutor em } \mu\text{g de maltose})] \times 1,9$; massa molar média = Mn = $[(\text{DPn}) \times 162] + 18$.

3.2.6. Hidrólise da dextrana por endodextranase

A dextrana produzida (10 mg) foi dissolvida em 960 µL de solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,5). Uma alíquota de 40 µL de endodextranase (5 IU/mL) foi adicionada e incubada a 37 °C por 14 horas. Alíquotas de 100 µL foram retiradas em 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 840 minutos.

5 µL de ácido trifluoracético foram adicionados à cada uma das alíquotas, que foram aquecidas a 50 °C por 10 minutos para parar a reação.

3.2.7. Análise dos produtos da hidrólise, usando cromatografia em camada delgada

Uma alíquota de 1 µL de cada amostra da hidrólise com endodextranase e padrões de isomaltodextrina e maltodextrina foram aplicados à 15 mm a partir da base da placa de CCD (Whatman 5K), com micro seringa Hamilton.

Os tamanhos das aplicações foram mantidos entre 2 e 3 mm pela adição de 1 µL por vez, secando nos intervalos. A placa foi irrigada até o topo de 20 a 22 °C usando acetonitrila/acetato de acetato de etila/1-propanol/água 85:20:50:70 (v/v/v/v) em três ascensões. Após a separação, os carboidratos puderam ser visualizados pelo mergulho da placa de CCD em solução de etanol contendo 0,5% (m/v) α-

naphthol e 5% (v/v) H_2SO_4 . Após a secagem, a placa de CCD foi colocada em forno por 10 minutos a 120 °C. As manchas dos carboidratos tiveram sua densidade mensurada pela utilização de Densitômetro de Imagem (Bio-Rad densitometer, Model GS-670).

3.2.8. Valores redutores dos produtos da hidrolise da dextrana

Os valores redutores dos produtos da hidrolise da dextrana foram quantificados pelo método bicinroninato de cobre (FOX e ROBYT, 1991). Os valores obtidos foram plotados versus tempo de reação.

3.2.9. Reação do acceptor com maltose e sacarose (1:1)

A reação enzimática foi preparada pela adição de 5 mL de sacarose 400 mM e maltose 400 mM preparados em solução tampão (piridina/acetato 20 mM, pH 5,2) à 5 mL da enzima dextranasacarase (2 IU/mL) produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B e incubada à 30 °C por 10 horas. Alíquotas de 200 µL foram retiradas em 5, 10, 30, 60, 120, 180, 300 e 600 minutos.

10 µL de ácido trifluoracético foram adicionados a cada alíquota, que foi aquecida à 50 °C por 10 minutos para parar a reação. A mesma reação foi conduzida com a dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC.

3.2.10. Análise dos produtos da reação do acceptor da dextranasacarase usando CCD

Uma alíquota de 1 µL de cada amostra e padrões de isomaltodextrinas foi aplicada à 15 mm da base da placa de CCD (Whatman 5K), com micro seringa Hamilton. O tamanho das aplicações foram mantidos entre 2 e 3 mm pela adição de 1 µL por vez, secando nos intervalos. A placa foi irrigada até o topo de 20 a 22 °C usando acetonitrila/acetato de acetato de etila/1-propanol/água 85:20:50:70 (v/v/v/v) em três ascensões. Após a separação, os carboidratos puderam ser visualizados pelo mergulho da placa de CCD em solução de etanol contendo 0,5% (m/v) α -naphthol e 5% (v/v) H_2SO_4 . Após a secagem, a placa de CCD foi colocada em forno por 10 minutos a 120 °C. As manchas dos carboidratos tiveram sua densidade mensurada pela utilização de Densitômetro de Imagem (Bio-Rad densitometer, Model GS-670).

3.2.11. Espectroscopia de ^1H NMR

Os espectros de ^1H NMR da dextran B512-F e FT045B foram obtidos em D_2O usando um Bruker spectrometer a 500 MHz (Germany).

3.2.12. Análise de espectrofotometria de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro FT-IR para as dextranas B512-F e FT045B foram obtidos pelo preparo de pastilha com 150 mg de KBr e 5 mg de dextrana sob pressão.

3.3. Otimização do meio de cultura para produção de dextranasacarase

3.3.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, isolada da produção de álcool em destilaria, cedido gentilmente pela FERMENTEC S/C LTDA Assessoria em açúcar e Álcool.

Cortezi, Monti e Contiero (2005) trabalharam com esta mesma cepa para a determinação do efeito da temperatura na produção de dextranasacarase.

3.3.2. Fonte de Carbono

O melaço utilizado neste trabalho é proveniente de um único fornecedor, armazenado em 1 galão de 20 litros, sob refrigeração à 8°C , durante todo o período experimental, para garantir a manutenção das características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas de sua composição.

Com o propósito de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, durante todo o trabalho, utilizou-se uma única amostra de melaço, evitando desta forma, a variação do produto, uma vez que amostras diferentes de melaço apresentam composição diversificada, pois dependem da sazonalidade de cada safra da cana-de-açúcar.

3.3.3. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Visando otimizar o processo em relação as seguintes variáveis operacionais: concentrações de MCA, AMM e K_2HPO_4 , fez-se necessário realizar um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Tabela 3.1) composto por um planejamento fatorial a dois níveis com três variáveis acrescido de réplicas no ponto

central e ainda 6 experimentos nos pontos axiais (α de ortogonalidade igual a 1,682), totalizando 17 experimentos.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada) na matriz de planejamento.

Tabela 3.1 - Matriz de planejamento experimental (DCCR) com três variáveis

Experimento	Variáveis		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	$-\alpha$	0	0
10	α	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	α	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

X_1 – Concentração de SCM (g/L);
 X_2 – Concentração de AMM (g/L);
 X_3 – Concentração de K_2HPO_4 (g/L).

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação geral de codificação (Equação 3.1):

Equação geral:

$$X_n = [(X - X_0)] / (X_{+1} - X_{-1}) / 2 \quad (3.1)$$

Sendo:

X é o valor da variável a ser calculado;
 X_0 é o valor da variável no ponto central;
 X_{+1} é o valor da variável no nível superior;
 X_{-1} é o valor da variável no nível inferior.

As equações codificadas utilizadas no experimento são demonstradas pelas Equações 3.2, 3.3 e 3.4.

Concentração de MCA:

$$X_1 = [\text{MCA (g/L)} - 40] / 10 \text{ (g/L)} \quad (3.2)$$

Concentração de AMM:

$$X_2 = [\text{AMM (g/L)} - 10,11 \text{ (g/L)}] / 7 \text{ (g/L)} \quad (3.3)$$

Concentração de K_2HPO_4 :

$$X_3 = [\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ (g/L)} - 20] / 5 \text{ (g/L)} \quad (3.4)$$

O valor de α adotado foi de 1,682, determinado pela Equação 3.5, e que conduz a um DCC Rotacional, ou seja, um planejamento onde a matriz da variância e covariância é diagonal e os parâmetros não são correlacionados (BOX, HUNTER e HUNTER, 1978).

$$\alpha = (\text{QG}/4)^{1/4} \quad (3.5)$$

Sendo,

$$Q = [(G + T)^{1/2} - G^{1/2}]^2$$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no DCCR, assim,

$T = 2^k + \text{número de réplicas centrais}$.

3.3.4. Meios de cultura

Cortezi, Monti e Contiero (2005) estudaram a produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B, utilizando o meio de cultura composto por sacarose (40 g/L), extrato de levedura (20 g/L), K_2HPO_4 (20 g/L), CaCl_2 (0,02 g/L), MgSO_4 (0,2 g/L), NaCl (0,01 g/L), FeSO_4 (0,01 g/L), MnSO_4 (0,01 g/L).

O presente estudo utilizou a mesma composição do meio que Cortezi, Monti e Contiero (2005), contudo as fontes de nitrogênio e carbono foram substituídas por AMM e MCA, respectivamente.

Três variáveis foram escolhidas para a determinação do efeito da relação destas variáveis sobre a produção da dextranasacarase: fonte de nitrogênio (AMM); fonte de carbono (MCA); e reagente tamponante (K_2HPO_4).

Foram utilizadas 15 diferentes composições de meio de cultivo para a produção da enzima dextranasacarase, sendo que o ponto central, representado pelo experimento 15 foi repetido mais duas vezes, experimento 16 e 17 como podem ser observados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos.

EXP	MCA (g/L)	AMM (g/L)	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	$MnSO_4$ (g/L)	NaCl (g/L)	$FeSO_4$ (g/L)	$CaCl_2$ (g/L)
1	30,00	3,11	15,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
2	30,00	3,11	25,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
3	30,00	15,00	15,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
4	30,00	15,00	25,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
5	50,00	3,11	15,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
6	50,00	3,11	25,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
7	50,00	15,00	15,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
8	50,00	15,00	25,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
9	23,20	10,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
10	56,80	10,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
11	40,00	0,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
12	40,00	20,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
13	40,00	10,00	11,59	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
14	40,00	10,00	28,41	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
15	40,00	10,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
16	40,00	10,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02
17	40,00	10,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02

O meio de cultivo utilizado para a preservação do micro-organismo está descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Meio de cultura estoque para preservação do micro-organismo.

MEIO CULTIVO	MCA (g/L)	AMM (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	MnSO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	FeSO ₄ (g/L)	CaCl ₂ (g/L)
Estoque	40,00	20,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02

O meio de cultivo utilizado no preparo do pré-inóculo não deveria conter AMM, para que não fossem alteradas as condições de cultivo do meio nº11, que apresenta concentração 0,00 g/L deste componente, além de que a sacarose deveria ser substituída pelo melaço para que a composição do meio utilizado para cultivo do pré-inóculo fosse condizente com as composições dos meios a serem estudados. Desta forma, a composição empregada para o cultivo do pré-inóculo encontra-se descrita na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Meio de cultivo para preparo do pré-inóculo.

MEIO CULTIVO	Me (g/L)	AMM (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	MnSO ₄ (g/L)	NaCl (g/L)	FeSO ₄ (g/L)	CaCl ₂ (g/L)
Pré-inóculo	40,00	0,00	20,00	0,20	0,01	0,01	0,01	0,02

3.3.5. Preparo da cultura estoque e preservação do micro-organismo.

O meio de cultura estoque utilizado para a preservação do micro-organismo foi descrito na Tabela 3.3. O cultivo foi interrompido com 8 horas de incubação, a 30°C e 150 rpm, e alíquotas de 2,0 mL foram retiradas para conservação em presença de 2,0 mL de glicerol 20% e estocadas em freezer a -15°C.

3.3.6. Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência de 15 diferentes meios de cultura na produção da enzima.

As condições de cultivo empregadas foram: 24°C, 150 rpm, pH 7,4 e volume de 150,0 mL de meio em erlenmeyer de 250,0 mL.

3.3.7. Preparo do pré-inóculo

Foram preparados 7,5 mL de pré-inóculo para todas as fermentações. O melaço, o fosfato bibásico de potássio e as soluções A (MgSO₄, MnSO₄, NaCl e

FeSO₄) e B (CaCl₂) foram autoclavados separadamente e o pH ajustado para 7,4 antes da esterilização em autoclave.

O meio foi autoclavado à 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, 100 mL da solução de sacarose foram adicionados a 142,5 mL da solução de fosfato monobásico de potássio, totalizando 242,5 mL, aos quais foram adicionados 2,5 mL da solução A e 2,5 mL da solução B (100 vezes concentradas) e logo após 2,5 mL de cultura estoque (correspondente a 1%) foram inoculados no meio. O meio inoculado foi incubado a 24 °C, sob agitação de 150 rpm por 36 horas.

3.3.8. Preparo do meio de cultivo

Foram preparados 150 mL de meio de cultivo para todas as fermentações. O melaço, a água de maceração de milho, o fosfato monobásico de potássio e as soluções A (MgSO₄, MnSO₄, NaCl e FeSO₄) e B (CaCl₂) foram esterilizados separadamente e o pH ajustado para 7,4 antes da esterilização.

O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento 30 mL da solução de sacarose foram adicionados a 50 mL da solução de fosfato monobásico de potássio e a 39,5 mL da solução de água de maceração, totalizando 139,5 mL, aos quais foram adicionados 1,5 mL da solução A e 1,5 mL da solução B (100 vezes concentradas) e logo após, 7,5 mL de cultura estoque (correspondente a 5%) foram inoculados no meio. O meio inoculado foi incubado a 24 °C, sob agitação de 150 rpm por 48 horas.

3.3.9. Determinação da concentração celular

A concentração de células no meio de cultivo foi determinada por meio da leitura em espectrofotômetro a 650 nm. A relação da densidade ótica (DO) com a massa celular foi determinada com a construção de curva padrão DO versus massa seca. Foram preparados 45 mL de meio de cultivo e este foi inoculado com 5 mL de cultura estoque.

Amostras de 20 mL desta cultura com 8 horas de incubação foram retiradas e centrifugadas por 10 minutos a 13300 g. O sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi novamente descartado. A seguir, as células foram ressuspensas em aproximadamente 2 mL de água destilada e colocada em forminhas de alumínio previamente tarada e em seguida levadas à estufa a 90°C para secagem durante 12

horas. Após o período de secagem, as forminhas foram pesadas para obtenção da biomassa.

Para se obter a curva de biomassa versus absorbância, 20 mL desta cultura de 8 horas foi centrifugada seguindo-se os mesmos procedimentos citados anteriormente. Em seguida, as células foram resuspendas em 20 mL de água destilada. Para a leitura da absorbância ($\lambda = 650\text{nm}$) a suspensão de células foi diluída 10, 30, 60, 100, 150 e 210 vezes.

Durante o decorrer da fermentação, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL da cultura, a cada 12 horas e centrifugadas por 10 minutos a 13300 g para a determinação da concentração celular. O sobrenadante foi guardado para posterior análise da atividade enzimática e ART (açúcar redutor total). As células foram lavadas novamente com 1,0 mL de água destilada e centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e as células ressuspendas ao volume inicial (1,0 mL) com água destilada e agitados em agitador de tubos.

Em seguida foi realizada a leitura dessas suspensões em espectrofotômetro a $\lambda=650\text{nm}$.

3.3.10. Determinação de ART (açúcar redutor total)

Para determinação do consumo de substrato pelo micro-organismo, foi utilizado o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). Para tanto foi necessário fazer a conversão da sacarose em açúcares redutores através da hidrólise ácida.

Para realização do método, adicionou-se 0,06 mL da amostra, 0,06 mL de ácido clorídrico 2 M, em seguida levou-se ao “banho-maria” à 100°C por 10 minutos. Resfriou-se imediatamente em banho de gelo (0°C), adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio 2 M. Uma alíquota de 0,05 mL da amostra já neutralizada foi retirada e adicionada a 0,05 mL de DNS, a mistura foi levada ao aquecimento em “banho-maria” a 100°C por 5 minutos e posteriormente resfriada em banho de gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 1,4 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

A reação de DNS com açúcares redutores produz coloração que vai desde amarelo claro a marrom escuro, coloração proporcional à concentração de açúcares redutores contidos na amostra. Quanto maior a concentração de açúcares redutores, mais intensa é a coloração marrom.

Para converter absorbância em concentração de açúcares redutores construiu-se uma curva padrão de sacarose (concentração/absorbância).

3.3.11. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi conduzida conforme procedimento anteriormente desenvolvido: Item 3.1.3. Método (III) Gravimétrico

3.3.12. Produção de dextranasacarase em biorreator

De posse das melhores condições experimentais encontradas na etapa anterior, foi realizado um estudo da aeração e da agitação durante a fermentação para obtenção de maiores rendimentos da enzima dextranasacarase. Assim, foi feito planejamento fatorial completo com nove experimentos com variações nos valores da aeração e agitação (Tabela 3.5), sendo avaliadas as respostas de atividade enzimática, concentração celular e consumo de substrato durante a produção da enzima dextranasacarase.

Tabela 3.5 - Matriz de planejamento experimental Fatorial Completo com duas variáveis.

Experimento	Variáveis	
	X ₁	X ₂
A	-1	-1
B	-1	0
C	-1	1
D	0	-1
E	0	0
F	0	1
G	1	-1
H	1	0
I	1	1

X₁ – VA (rpm); X₂ – VA (vvm)

Foi feito planejamento fatorial completo com nove experimentos com variações nos valores de aeração em vvm (0,0; 0,5 e 1,0) e agitação em rpm (100; 150 e 200), com o intuito de estudar o efeito da relação entre a vazão de ar e a velocidade de agitação sobre a produção da enzima dextranasacarase, durante a fermentação em biorreator com a cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Para

esta avaliação foram consideradas como variáveis de resposta a atividade enzimática da enzima dextranasacarase produzida, o crescimento microbiológico e o consumo de substrato.

O biorreator utilizado possui capacidade total para 2 L, contendo 1,2L de volume de trabalho, equipado com sistema de controle de agitação, temperatura, aeração e pH. As condições de pH e temperatura foram mantidas constantes em 6,7 e 26°C respectivamente.

As condições de agitação e aeração foram mantidas de acordo com valores determinados pelo planejamento, através de um agitador e de um aerador, ambos com controladores. Não foi necessário o uso de coletores de espuma devido à natureza do caldo formado.

Tabela 3.6 - Matriz do planejamento fatorial completo a três níveis

EXP.	VA (rpm)	TA (vvm)
A	100	0,0
B	100	0,5
C	100	1,0
D	150	0,0
E	150	0,5
F	150	1,0
G	200	0,0
H	200	0,5
I	200	1,0

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a equação geral de codificação (Equação 3.6). As equações codificadas utilizadas no experimento são demonstradas pelas Equações 3.6 e 3.7.

$$\text{Taxa de Aeração (TA): } X_1 = [TA - 0,5] / 0,5 \quad (3.6)$$

$$\text{Velocidade de Agitação (VA): } X_2 = [VA - 150] / 50 \quad (3.7)$$

Assim como no DCCR, os experimentos referentes ao planejamento fatorial completo também foram avaliados quanto à atividade enzimática,

concentração celular e consumo de substrato. As amostras foram retiradas em intervalos de 2 horas, totalizando 10 horas de fermentação em cada ensaio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo comparativo de 11 diferentes métodos para Análise da Atividade da Dextranasacarase e enzimas relacionadas

Onze diferentes métodos, para analisar a atividade da dextranasacarase foram comparados e avaliados quanto sua eficiência. Eles podem ser divididos em dois distintos tipos; (A) métodos diretos, no qual a dextrana sintetizada é isolada e quantificada, e (B) métodos indiretos, que quantificam a D-frutose, que é liberada da sacarose enquanto a D-glicose é incorporada à dextrana. O primeiro grupo consiste em cinco métodos que quantificam a dextrana produzida; o segundo grupo consiste em cinco diferentes métodos colorimétricos de quantificação da D-frutose produzida, pela leitura do valor redutor e um sexto método que quantifica a D-frutose enzimaticamente.

a) Grupo A, medições diretas da quantidade de dextrana sintetizada:

No método I, ^{14}C -dextrana produzida pela ação da dextranasacarase em ^{14}C -sacarose é precipitada pela adição de etanol. Esta precipitação é repetida mais duas vezes para remoção da ^{14}C -frutose liberada, sacarose não reagida e da leucrose e da D-glicose possivelmente formadas. A quantidade de dextrana produzida é determinada por contagem em espectrômetro de cintilação.

O método II foi descrito por Germaine, Schachtele e Chludzinski (1974) e envolve a adição direta da solução de reação da dextranasacarase em ^{14}C -sacarose em papel Whatman de 3mm^2 , e lavagem imediata em metanol (3 vezes) para remover a D-frutose liberada, a sacarose não reagida e alguma D-glicose formada. O papel filtro é colocado em coquetel de tolueno e a dextrana é quantificada em espectrômetro de cintilação.

O método III envolve a precipitação da dextrana diretamente da solução reacional com 2 volumes de etanol. A precipitação é repetida mais duas vezes, seguida pela desidratação da dextrana por três tratamentos consecutivos com acetona, tratamento com etanol anidro e aquecimento para secagem sob lâmpada infravermelha. A quantidade de dextrana é então pesada.

O método IV envolve o uso de CCD no qual uma alíquota da reação dextrana/sacarose é adicionada à placa de CCD, para a separação da D-frutose, da sacarose (não reagida) e da leucrose e da D-glicose. A dextrana permanece na origem da aplicação e é determinada por escaneamento densitométrico do cromatograma (MUKERJEA, KIM e ROBYT, 1996).

A média dos resultados de atividade enzimática para a dextranasacarase B512FMC dos quatro métodos e seus desvios padrões da análise em triplicata estão dispostos na tabela 4.1.1 Os métodos I e III apresentaram o mesmo valor de 168 IU (International Units). O método II proporcionou valor significativamente mais baixo de 105 IU, devido às lavagens com metanol removerem parte da dextrana formada. Este método também apresentou alto desvio padrão. O método IV também apresentou baixo valor de atividade 151 IU, que se acredita ser devido certas dificuldades de medição da densidade no ponto de origem do cromatograma.

O quinto método, envolvendo a análise em placa de CCD da D-frutose formada por escaneamento densitométrico, foi executada apenas uma vez e mostrou ser um procedimento longo e trabalhoso, envolvendo quantidade considerável de tempo. Esta análise requer três ascensões com conjunto de solventes e mais duas ascensões com um segundo conjunto de solventes para conseguir separar completamente a D-frutose da D-glicose. Este método, contudo deu resultado de 167 IU, muito próximo dos resultados obtidos pelos métodos I e III, 168 IU.

A tabela 4.1.1 mostra que todos os métodos usados para quantificar a frutose liberada durante a ação da dextranasacarase em presença da sacarose proporcionam resultados de atividade muito altos ou muito baixos, exceto o método V. Contudo o extensivo tempo necessário para a irrigação das placas quatro vezes, torna este método impraticável.

O menor resultado, obtido pelo método X provavelmente pode ser explicado pela reação de aceitação com a frutose liberada, durante a incubação ou pela ineficiência do método utilizado. A atividade mais alta, obtida pelos métodos VI, VII e IX podem ser explicados pela oxidação das dextrinas (BEMILLER, 1965). Pode-se entender, analisando a figura 4.1.1, que ilustra o efeito do comprimento das cadeias de maltodextrinas na determinação dos valores redutores. O valor redutor (μg maltose/mL) de cada maltodextrina foi plotado contra o grau de polimerização das dextrinas. Os resultados foram obtidos por análise dos valores redutores pelos

métodos do ácido dinitrosalicílico (DNS), ferricianeto/arsenomolibdato alcalinos e bicinroninato de cobre.

Tabela 4.1.1 A atividade da dextranasacarase B512FMC analisada por 11 métodos diferentes, considerando que 1 unidade de dextranasacarase corresponde à quantidade de enzima que incorpora μmol de glicose na dextrana por minuto.

Método	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
I	169	169	168	168	1
II	105	116	95	105	10
III	168	170	165	168	2
IV	151	151	151	151	0
V	167	--	--	167	--
VI	606	622	59	606	16
VII	308	327	288	308	20
VIII	179	188	183	183	4
IX	332	359	369	353	19
X	149	149	149	149	0
XI	114	114	114	114	0

O método II, no qual a dextrana produzida com ^{14}C -sacarose é precipitada imediatamente em papel filtro e lavada em metanol, seca e a quantidade de glicose incorporada na dextrana é calculada imediatamente usando um espectrofotômetro de cintilação, provavelmente causa perda de pequenas moléculas de dextrinas durante a lavagem com metanol, pois sua fixação em papel possivelmente não é eficaz. A solução proposta para este problema deve ser o método I, no qual a dextrana produzida é precipitada em etanol, seguida de três lavagens em água e precipitações, usando tubo de centrífuga de 0,75 μL de volume. Neste caso, toda dextrina produzida é mantida junto à dextrana produzida para que sejam contadas em espectrofotômetro de cintilação.

b) Grupo B, análise da D-frutose em meio reacional sacarose/dextranasacarase por quatro métodos de valores redutores e por um método enzimático:

O método V consistiu na medição do valor redutor pelo reagente alcalino DNS (DNS método) diretamente de alíquotas retiradas da reação dextranasacarase/sacarose. Este método proporciona valor extremamente alto para a atividade enzimática, 606 IU, o mais alto entre todos os métodos testados. Este resultado não é realmente inesperado, uma vez que Robyt e Whelan (1965 e 1972)

havia reportado que o método DNS alcalino produzia uma oxidação dos carboidratos, monossacarídeos e especialmente oligossacarídeos e polissacarídeos, causando reação oxidativa que quebra a cadeia de sacarídeos, gerando resultados de valores redutores extremamente altos.

Este comportamento foi confirmado por Breuil e Saddler (1985). A super oxidação de quantidades equimolares de maltodextrinas (maltotriose até malto hexaose) pelo método DNS e pelo método por ferricianeto estão dispostos na Fig. 4.4.1. Com o aumento do tamanho da cadeia do oligossacarídeo, a oxidação aumenta. Conseqüentemente, o resultado obtido para a atividade da dextranasacarase, utilizando este método sofre aumento de 168 para 606 IU devido à oxidação de ambos D-frutose e dextrana. Este método conseqüentemente proporciona valores inapropriados para a análise da atividade enzimática e para estudos cinéticos da dextranasacarase e de enzimas relacionadas.

O método VI mensura o valor redutor por DNS após a remoção da dextrana por precipitação com etanol. Este método também proporcionou resultado alto de atividade enzimática, 308 IU, devido à oxidação da D-frutose e da leucrose, presentes na alíquota da reação enzimática. Este valor obtido foi alto, mas bem menor que o método anterior, devido à remoção da dextrana, confirmando a oxidação da dextrana no método V.

O método VII também mede o valor redutor presente na solução da reação sacarose/dextranasacarase, após a remoção da dextrana por precipitação com etanol. O método empregado para a determinação do valor redutor, neste caso foi o ferricianeto/arsenomolibdato (TING, 1956), que também gerou resultado de atividade bastante alto de 353 IU, com desvio padrão relativamente alto. Este comportamento também é devido às condições altamente alcalinas requeridas para a redução, dando uma super oxidação, incorrendo em erros no estudo da atividade enzimática e para estudos cinéticos.

O método VIII é mensurado pelo valor redutor do bicinroninato de sódio (ROBYT e WHELAN, 1972), após remoção da dextrana por precipitação com etanol. Este método proporcionou atividade de 183 IU, valor bem abaixo daqueles valores obtidos pelos métodos DNS e ferricianeto/arsenomolibdato alcalinos. O método por bicinroninato de cobre é mais sensível de todos os métodos conhecidos para quantificação de valores redutores e proporcionou valor de 15 IU acima dos valores encontrados pelos métodos diretos I e III. Isto deve ser explicado por oxidação

pouco intensa da D-frutose, apesar deste método não oxidar os oligossacarídeos e os polissacarídeos, como pode ser visualizado na Fig. 4.1.1, sendo este método sensível o suficiente para quantificar o valor redutor dos polissacarídeos e também podendo ser usado para a determinação da massa molar média de polissacarídeos (BREUIL e SADDLER, 1985; ROBYT e WHELAN, 1972; ROBYT e WHELAN, 1965).

O método X utilizou um kit enzimático obtido da Megazyme, que determina ambos D-glicose e D-frutose. Este método proporciona resultado relativamente baixo de atividade enzimática de 149 IU. Este método é bastante similar ao método IV que deu resultado de 151 IU. Ambos deram valores 19 e 17 unidades respectivamente, abaixo dos valores encontrados nos métodos I e III.

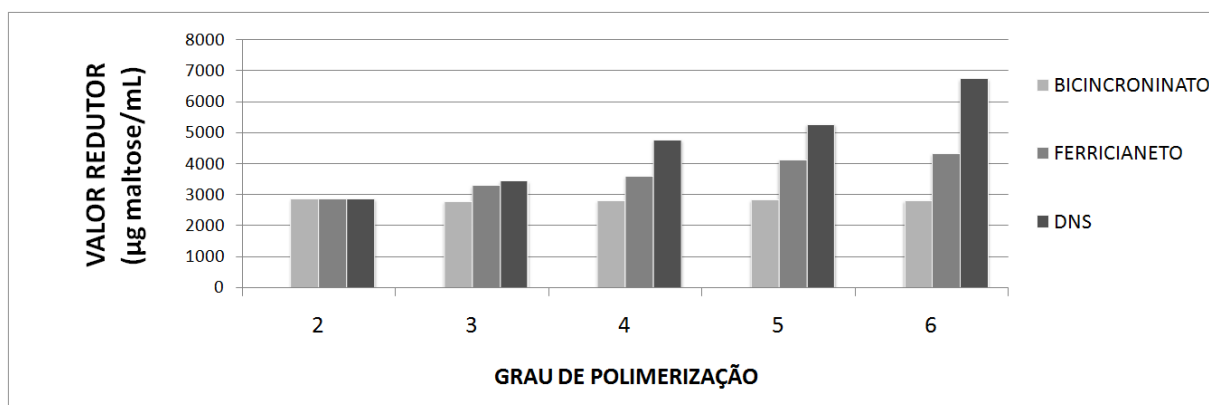


Figura 4.1.1 Valores redutores versus o grau de polimerização (DP) de cada maltodextrina (maltose até maltohexaose) usando a base molar, empregando três diferentes métodos padronizados com maltose.

A figura 4.1.1 mostra o resultado dos métodos DNS e ferricianeto/arsenomolibdato alcalino frente ao aumento do tamanho molecular das cadeias de maltodextrinas, mesmo utilizando valores equimolares de cada isomaltose. A mesma figura mostra que o reagente bicincroninato de cobre proporciona resultados iguais de valores redutores para diferentes tamanhos de cadeias. O método ferricianeto/arsenomolibdato alcalino proporciona menor valor redutor quando se compara com os resultados obtidos pelo método DNS, devido as condições de reação (temperatura de 55 °C durante 30 minutos), sendo que as amostras não são colocadas em ebulição como no método DNS.

4.1.2. Atividade da dextranasacarase produzida pela linhagem de *L. mesenteroides* obtida no Brasil.

Devido aos resultados de atividade enzimática obtidos para a dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC, também se utilizou os métodos I e III para analisar a enzima produzida pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.2, mostrando os mesmos valores relativos de 1.98 IU obtidos pelo método I e III para esta enzima, e valores mais baixos de 1.10 IU pelo método II, consistentes como os resultados obtidos para a dextranasacarase B-512FMC.

Tabela 4.1.2: A atividade da dextranasacarase FT045B analisada por 3 métodos diferentes, considerando que 1 unidade de dextranasacarase corresponde à quantidade de enzima que incorpora μmol de glicose na dextrana por minuto

Método	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvio Padrão
I	1,9	2,0	2,0	2,0	0,1
II	1,1	1,1	1,1	1,1	0,0
III	1,9	2,0	2,0	2,0	0,0

As tabelas 4.1.1 e 4.1.2 mostraram que o método gravimétrico e o método de precipitação por ^{14}C -sacarose proporcionaram os mesmos resultados de atividade da dextranasacarase, independentemente da origem da enzima e da atividade da mesma.

4.2. Caracterização da nova dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

A dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B apresentou massa molar média de 91.535,56 Da e grau de polimerização 564,92. Estes dados foram obtidos pela quantificação dos grupos redutores e dos carboidratos totais.

A hidrólise da dextrana pela endodextranase requer um mínimo de seis ou sete unidades de glicose ligadas por α -(1,6), sem substituições (BOUNE, HUSTON e WEIGEL, 1962; RICHARDS e STREAMER, 1978; CÔTÉ e ROBYT, 1984). Desta forma a dextrana FT045B foi submetida a esta hidrólise para garantir que se tratava de dextrana real, com predominância de ligações α -(1,6) formando a cadeia principal e não de outro tipo de glucana (DOLS, REMAUD-SIMEON et al.,

1998; BUCHHOLZ e MONSAN, 2001; SEYMOUR e KNAPP, 1980). Os produtos da hidrólise aplicados à placa de CCD estão ilustrados na Figura 4.2.1.

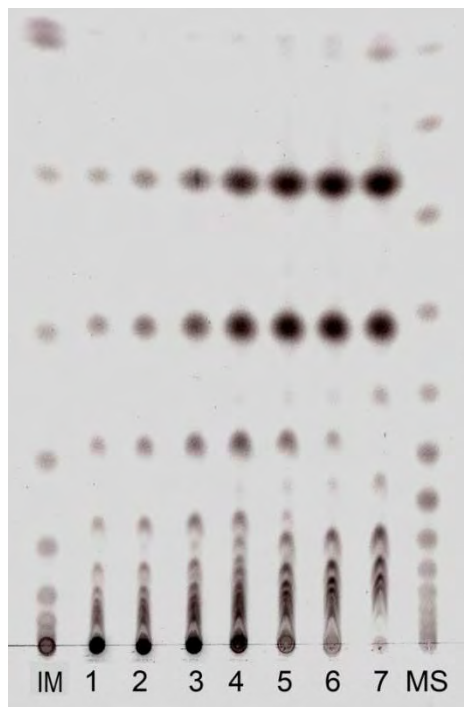


Figura 4.2.1: Análise em CCD dos produtos da hidrólise da dextrana FT045B com endodextranase (0.2 IU/mL) à 37° C por 840 min; Coluna 1 – amostras retiradas em 10 min; Coluna 2 – amostras retiradas em 20 min; Coluna 3 – amostras retiradas em 30 min; Coluna 4 – amostras retiradas em 60 min; Coluna 5 – amostras retiradas em 90 min; Coluna 6 – amostras retiradas em 120 min; Coluna 7 – amostras retiradas em 840 min; IS = padrões de isomaltodextrinas; MS = padrões de maltodextrinas

A concentração dos açúcares redutores foi determinada em cada amostra. O limite da hidrólise por endodextranase foi expressa como conversão aparente em isomaltose e calculada como conversão em maltose. A figura 4.2.2 ilustra o comportamento dos grupos redutores dos produtos da hidrólise com relação ao tempo.

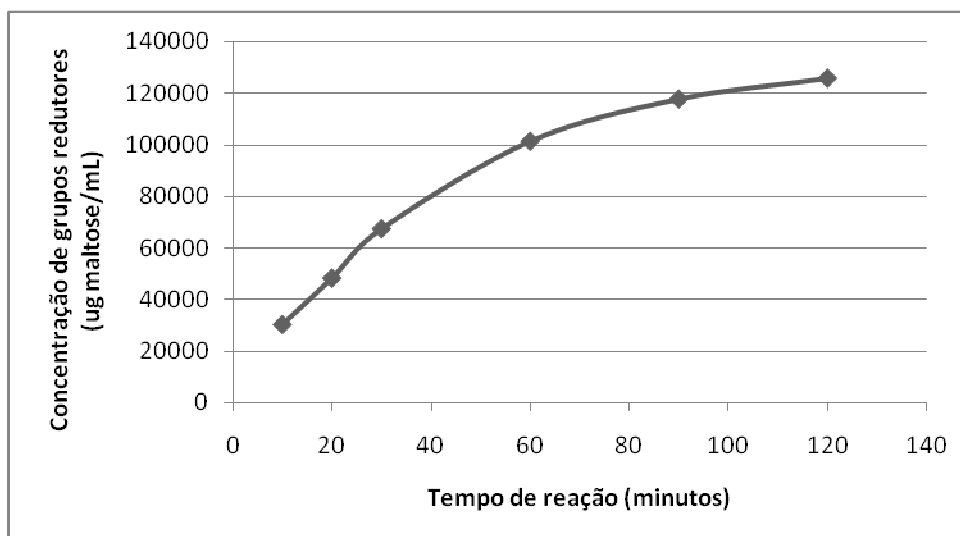


Figura 4.2.2: Concentração dos grupos redutores (expressos em µg/mL de maltose) dos produtos da hidrólise da dextrana FT45B com endodextranase em função do tempo (min).

Os principais produtos da hidrólise com dextranase de *Penicillium* sp foram isomaltose e isomaltotriose. Estes produtos são característicos de hidrólise na região α -(1,6) da cadeia das glucanas. A figura 4.2.3 mostra a porcentagem destes dois principais produtos com relação ao tempo.

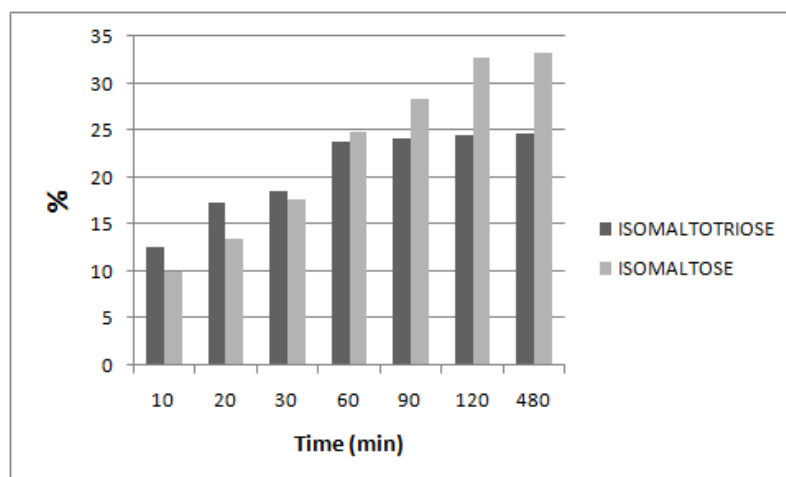


Figura 4.2.3: Porcentagem dos principais produtos (isomaltotriose e isomaltose) resultantes da hidrólise da dextrana FT045B com endodextranase em função do tempo

A ação das endodextranases na maioria das dextranas é limitada devido à sua inabilidade de hidrolisar ligações secundárias, tais como α -(1,3), α -(1,4) ou α -(1,2). Mesmo a dextrana B-512F, com menos de 5% de ramificações α -(1,3), não pode ser hidrolisada mais que 20 a 30 %. A dextrana FT045B foi suscetível à

degradação pela endodextranase e foi quase completamente degradada. Isto indica que a dextrana FT045B é composta de menos que 5% de ramificações α -(1-3).

Outros carboidratos, além da glicose na reação com a dextranasacarase, também podem ser incorporados à dextrana (KOEPSSELL, TSUCHIYA et al., 1953; TSUCHIYA, HELLMAN et al., 1955). Este tipo de reação é denominado reação do aceptor, pois o carboidrato incorporado funciona como aceptor na reação enzimática (ROBYT e EKLUND, 1983). Quando a maltose é o aceptor, a glicose a partir da sacarose é transferida tanto para o grupo 6-hidroxila do monossacarídeo ou para o grupo 6-hidroxila do final não redutor do resíduo da glicose para aumentar o comprimento dos isomalto-oligossacarídeos de 2 a 7 graus de polimerização ligados ao aceptor (ROBYT e EKLUND, 1983; ROBYT e WALSETH, 1979). O primeiro produto na série com maltose é a panose [6^2 -O- α -D-glucopyranosylmaltose] (KILLEY, DIMLER e CLUSKEY, 1955). O próximo produto da série das maltoses é um tetrassacarídeo, [6^2 -O- α -D-isomaltosylmaltose], e os outros membros da série com o aumento do grau de polimerização com a maltose ligada ao grupo não redutor do resíduo de glicose (KILLEY, DIMLER e CLUSKEY, 1955).

Os produtos da reação aceitação da maltose com a dextranasacarase estão ilustrados na Figura 4.2.4 e as respectivas porcentagens dos principais produtos, na Figura 4.2.5. A panose correspondeu a mais de 20% para a dextranasacarase FT045B e B512FMC e o oligossacarídeo ramificado DP4, a 13% para a dextranasacarase B512FMC e 19% para a dextranasacarase FT045B.

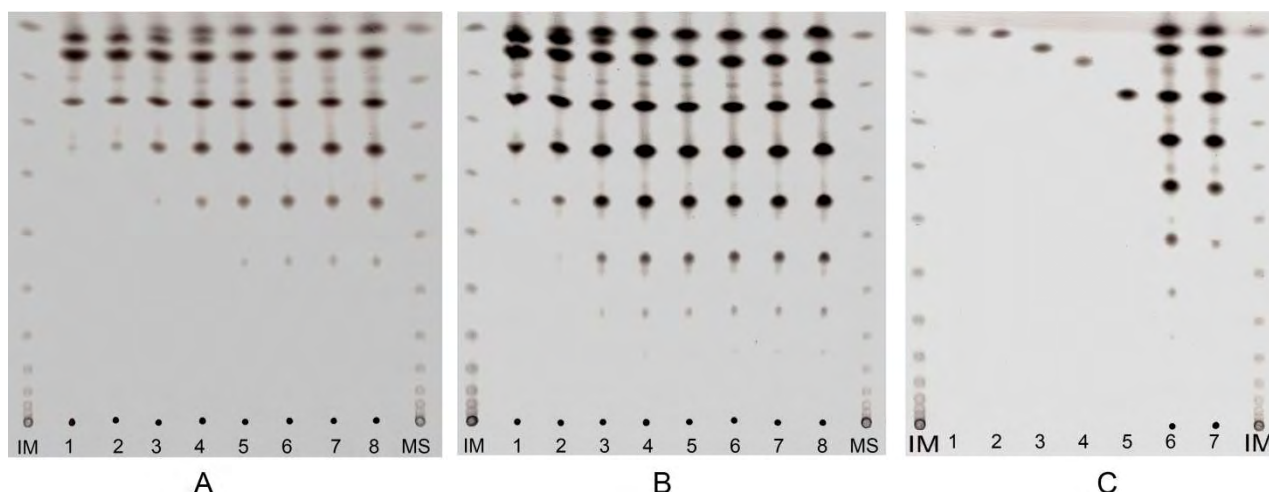


Figura 4.2.4. Análise em CCD dos produtos resultantes da Reação do aceptor com a dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B (A) e B512FMC (B) com maltose 200 mM e sacarose 200 mM à 30° C. Colunas de 1 a 8 (A e B), amostras retiradas em 5, 10, 30, 60, 120, 180, 300, e 600 min; Coluna 1 (C), frutose; Coluna 2 (C), sacarose; Coluna 3 (C), maltose; Coluna 4 (C), lucrose, Coluna 5 (C), panose, Coluna 6 (C), amostra da reação com a dextranasacarase B512F; Coluna 7 (C), amostra da reação com a dextranasacarase FT045B. ; IM = padrões de isomaltodextrinas; MS = padrões de maltodextrinas

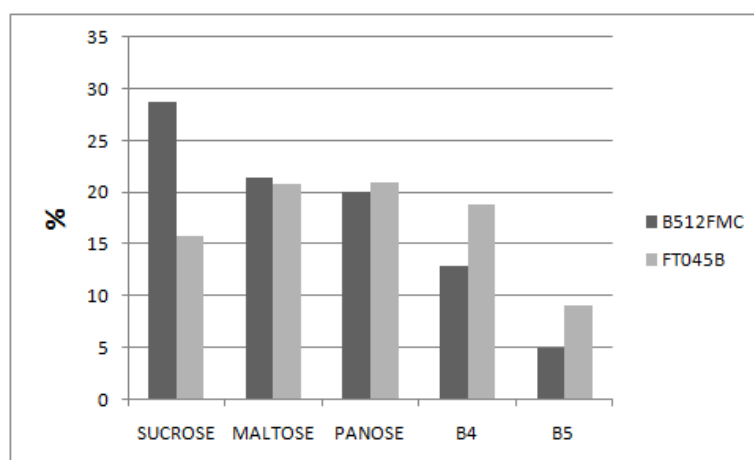


Figura 4.2.5: Porcentagem dos produtos resultantes da Reação do aceptor da dextranasacarase FT045B e B512FMC com maltose 200 mM e sacarose 200 mM a 30° C por 600 min; B4 = oligossacarídeo ramificado 4, DP 4; B5 = oligossacarídeo ramificado, DP 5

O espectro de Infravermelho foi usado para investigar os grupos funcionais da dextrana comercial B512F e FT045B e sua natureza em termos de unidades monoméricas e ligações. A figura 4.2.6 mostra o espectro de infravermelho FT-IR da dextrana comercial e da dextrana FT045B.

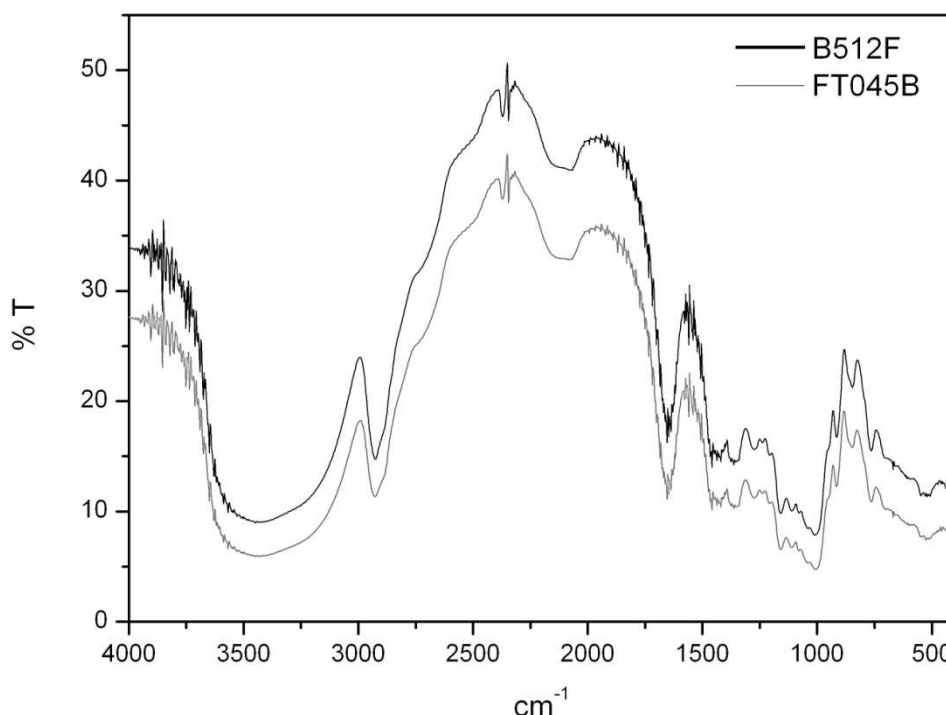


Figura 4.2.6: Espectro de FTIR para a dextrana comercial B512F da Sigma e para a dextrana FT045B

Ambas as dextranas apresentaram espectros similares. As dextranas FT045B e B512F contêm ligações α -(1,6), como demonstrado pelo pico em 1010 cm^{-1} , o qual caracteriza a flexibilidade da cadeia da dextrana (SHINGEL, 2002). As ligações α -glicosídicas também foram confirmadas pelo pico em 916 cm^{-1} e pela banda em 1159 cm^{-1} , causados pelas vibrações covalentes das ligações C-O-C e da ponte glicosídica. As ligações α (1,6) foram também confirmadas pela análise de ^1H -RMN. O pico em 1111 cm^{-1} foi devido à vibração da ligação C-O na posição C-4 no resíduo de glicose (SHINGEL, 2002). A vibração do grupo hidroxila do polissacarídeo causou a banda na região em 3410 cm^{-1} e a vibração das ligações C-H causaram a banda na região 2926 cm^{-1} (LIU, LIN et al., 2007). A banda na região 1639 cm^{-1} foi devido ao grupo carboxílico (CAO, LI et al., 2006) (LIU, LIN et al., 2007).

Resultados de ^1H NMR obtidos experimentalmente e reportados pela literatura estão dispostos na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1. Valores individuais da ^1H NMR (B512-F e FT045B) reportados na literatura e evidenciados experimentalmente

	B512-F	B512-F	FT045B
	(valores reportados)	(experimental)	(experimental)
	^1H (ppm) _a	^1H (ppm)	^1H (ppm)
C1-H	4,99	4,91	4,90
C2-H	3,60	3,50	3,51
C3-H	3,76	3,65	3,63
C4-H	3,52	4,45	3,42
C5-H	3,88-4,04	3,85	3,85
C6-H	3,88-4,04	3,93	3,95
C6'-H	3,81-3,86	3,70	3,70

_a (GIL, COLARTE et al., 2008)

A Fig. 4.2.7 mostra o espectro de ^1H RMN da dextrana nativa B512F e da dextrana FT045B em D_2O . Ambos os espectros se mostraram similares (Fig. 7). Baseado nos resultados, as dextranas B512-F e FT045B têm estruturas muito parecidas. Este fato também pode ser confirmado na Tabela 4.2.2, que mostra diferentes estruturas de dextranas reportadas na literatura.

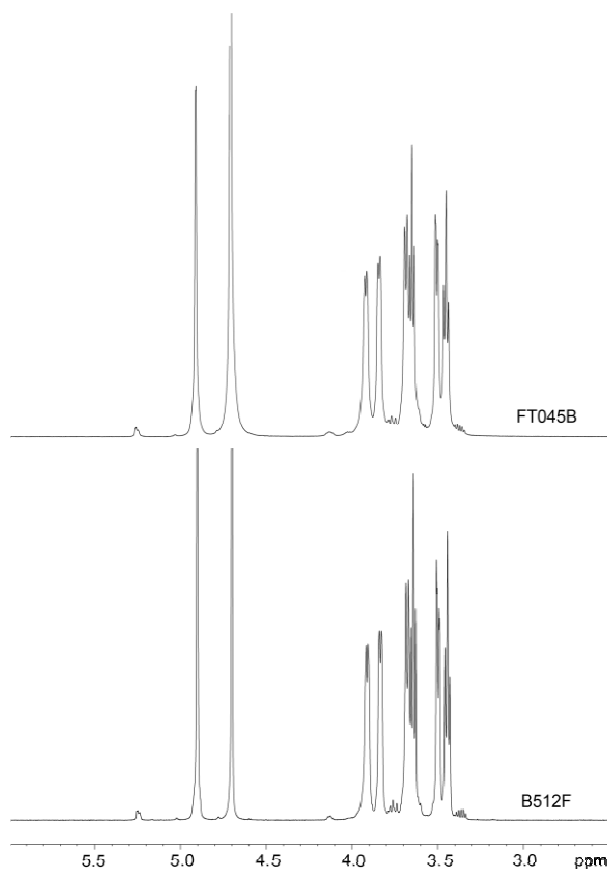


Figura 4.2.7: Espectro de ^1H NMR das dextrinas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* B512-F e FT045B em D_2O

Os espectros de ressonância magnética com próton anomérico a 500 MHz das ligações $\alpha(1,6)$ da dextrana estão dispostos na Fig. 8 (a) e (b). Os sinais que aparecem centralizados próximos a 5,25 ppm representam características estruturais importantes das ligações $\alpha(1,3)$. O pico em 4,90 ppm é devido ao H-1 das ligações $\alpha(1,6)$ na cadeia principal (SEYMOUR, 1979). A integração dos sinais 5,25 e ~4,90 dá a porcentagem de ligações $\alpha(1,3)$ e $\alpha(1,6)$, respectivamente (Tabela 4.2.2).

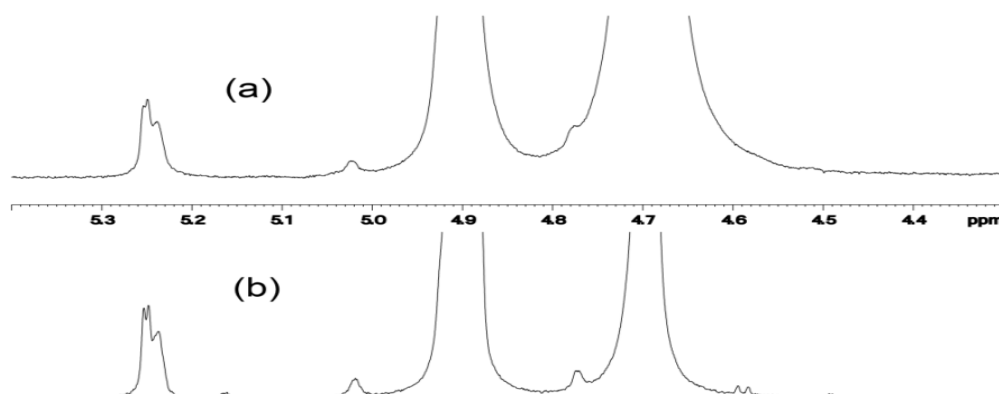


Figura 4.2.8: Regiões anoméricas de 500 mHz do próton no espectro de RMN (a) dextrana FT045B (b) dextrana B512F

Tabela 4.2.2. Diferentes ligações estruturais encontradas em series de dextrinas reportadas na literatura_a

			Ligações osídicas (%)				
			α -1,6	α -1,3	α -1,3 ramificações	α -1,4 ramificações	α -1,2 ramificações
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FT 045B	S _b	95		2,1		
	B 512 F	S	95		5		
	B-742	L _c	87			13	
	B-742	S	50		50		
	B-1355	L	95		5		
	B-1355	S	54	35	11		
	B-1299	L	66		7		27
	B-1299	S	65				35
	B-1498	S	50	50			
	B-1501	S	50	50			
<i>Streptococcus downei</i>	Mfe28		12	88			
	Mfe28		90	10			
<i>Streptococcus mutans</i>	GS5		13	87			
	GS5		15	85			
	GS5		70	30			
	6715	S	64		36		
	6715	I _d	4	94	2		

_aAdaptado de (MONSAN, BOZONNET, et al., 2001)

_b(S = solúvel)

_c(P = Pouco solúvel)

_d(I = insolúvel)

Foi reportado que várias dextranas apresentam as ressonâncias (C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6) na região de 3 a 4 ppm e a ressonância do hemiacetal C-1 na região de 3 a 6 ppm (SIDEBOTHAM, 1974; SEYMOUR, 1979). A ressonância dos prótons anoméricos do final redutor também foram detectáveis na dextrana B512F: pico α centralizado em 5,18 ppm e pico β em 4,60 ppm. A integração e a correlação das áreas $\alpha + \beta$ -livre com a ressonância total dos anoméricos (pico centralizado em 4,90 ppm) dá o grau de ramificação (385) ou a massa molar média (62,308 Da). Para a dextrana FT045B, os picos α e β não puderam ser vistos, devido à alta massa molar da dextrana.

4.3. Otimização da produção de dextranasacarase

4.3.1. Otimização do meio de cultura por DCCR - Atividade Enzimática

Os efeitos das concentrações de AMM, MCA e K_2HPO_4 no rendimento da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B foram testados. Os experimentos foram conduzidos conforme DCCR, planejamento que permite calcular com a melhor precisão possível os efeitos e interações de cada variável selecionada, utilizando número mínimo de experimentos. A tabela 4.3.1 mostra os resultados de atividade enzimática da dextranasacarase para cada um dos experimentos, em 24 horas de fermentação.

Tabela 4.3.1. Resultados da atividade da dextranasacarase em 24 horas de fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B.

EXP.	[X ₁] MCA (g/L)	[X ₂] AMM (g/L)	[X ₃] K ₂ HPO ₄ (g/L)	Atividade da Dextranasacarase (IU/mL)
1	30,00	3,11	15,00	1,23
2	30,00	3,11	25,00	1,52
3	30,00	17,11	15,00	2,62
4	30,00	17,11	25,00	3,25
5	50,00	3,11	15,00	1,43
6	50,00	3,11	25,00	1,81
7	50,00	17,11	15,00	2,29
8	50,00	17,11	25,00	2,50
9	23,20	10,11	20,00	0,41
10	56,80	10,11	20,00	0,23
11	40,00	0,00	20,00	1,79
12	40,00	21,77	20,00	4,03
13	40,00	10,11	11,59	3,25
14	40,00	10,11	28,41	3,38
15	40,00	10,11	20,00	2,96
16	40,00	10,11	20,00	2,96
17	40,00	10,11	20,00	2,96

O maior valor de atividade da dextranasacarase foi obtido com a maior concentração de AMM. Considerando MCA como fonte de carbono e AMM como fonte de nitrogênio. Os experimentos conduzidos com concentrações constantes de K₂HPO₄ mostraram que o aumento da razão nitrogênio/carbono induz o aumento da atividade enzimática. Lopretti e Martinez (1999) também mostraram a mesma relação entre a razão nitrogênio/carbono e o rendimento de dextranasacarase.

O delineamento composto central rotacional utilizado neste processo foi muito interessante para avaliar os fatores que afetam a produção enzimática da dextranasacarase.

Após a realização da regressão múltipla no programa Statistica 7.1, obteve-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade da Dextranasacarase} = 2,926204 - 0,065402 X_1 + 0,618052 X_2 + 0,126671 X_3 - 0,196250 X_1 X_2 - 0,041250 X_1 X_3 + 0,021250 X_2 X_3 - 0,946852 X_1^2 - 0,029193 X_2^2 + 0,114302 X_3^2 \quad (4.1)$$

A tabela 4.3.2 apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla e a tabela 4.3.3, a ANOVA, para os resultados de atividade enzimática da dextranasacarase.

Tabela 4.3.2 – Resultados da regressão múltipla para a atividade enzimática

Fatores	Parâmetros	Nível de significância (p)
Constante (β_0)	2,963429	0,000000
X ₁ (MCA)	-0,065402	0,130810
X ₂ (AMM)	0,618052	0,000001
X ₃ (K ₂ HPO ₄)	0,126671	0,012871
X ₁ X ₂ (MCA.AMM)	-0,196250	0,005666
X ₁ X ₃ (MCA.K ₂ HPO ₄)	-0,041250	0,435872
X ₂ X ₃ (AMM. K ₂ HPO ₄)	0,021250	0,683118
X ₁ ² (MCA) ²	-0,946852	0,000000
X ₂ ² (AMM) ²	-0,029193	0,510492
X ₃ ² (K ₂ HPO ₄) ²	0,114302	0,030009
R ² = 0,98769836	F _C = 101,04	F(9,7)=3,68

Tabela 4.3.3 – ANOVA para a atividade enzimática

	SS	df	MS	F	p
(1)MCA (g/L)(L)	0,0376	1,0000	0,0376	1,7762	0,2244
MCA (g/L)(Q)	9,5744	1,0000	9,5744	451,7634	0,0000
(2)AMM (g/L)(L)	5,1574	1,0000	5,1574	243,3473	0,0000
AMM (g/L)(Q)	0,0000	1,0000	0,0000	0,0001	0,9943
(3) K ₂ HPO ₄ (g/L)(L)	0,2147	1,0000	0,2147	10,1287	0,0154
K ₂ HPO ₄ (g/L)(Q)	0,2154	1,0000	0,2154	10,1621	0,0153
1L por 2L	0,3008	1,0000	0,3008	14,1938	0,0070
1L por 3L	0,0136	1,0000	0,0136	0,6423	0,4492
2L por 3L	0,0010	1,0000	0,0010	0,0483	0,8324
Erro	0,1484	7,0000	0,0212		
Total SS	18,2675	16,0000			

Nesta regressão foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes, consideradas não relevantes. Assim, foram desprezados o termo isolado da concentração de MCA (X_1), o termo quadrático da concentração de AMM (X_2)², as interações das concentrações de AMM e K_2HPO_4 (X_2X_3) e das concentrações de MCA e K_2HPO_4 (X_1X_3).

A Tabela 4.3.1 mostra as variáveis que influenciam a atividade enzimática. Analisando esta tabela verifica-se que a combinação de maiores concentrações de AMM e K_2HPO_4 e concentrações em torno de 40 g/L de MCA resultaram em maior rendimento enzimático.

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,988 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta de atividade enzimática, mostrando que 98,8% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para nível de significância de 5%, ou seja, tem-se confiança de 95% que o modelo é significativo. A figura 4.3.1 mostra a representação dos resultados preditos versus observados.

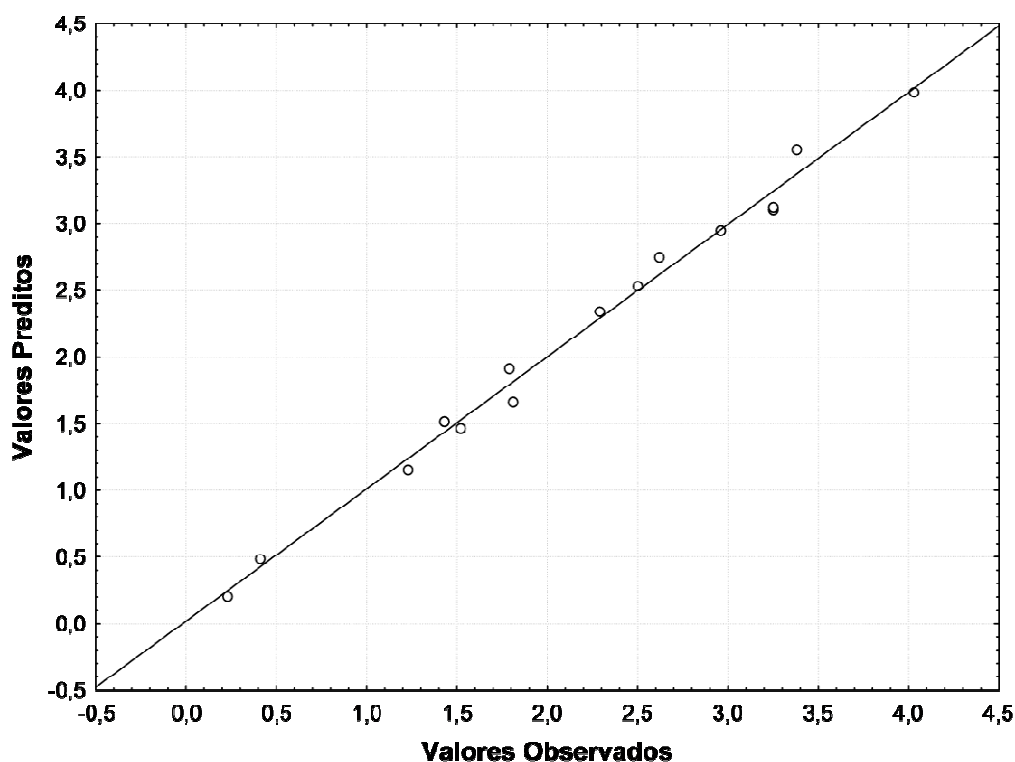


Figura 4.3.1 – Resultados preditos em função dos observados relativos à atividade enzimática da dextranasacarase.

Observando a Figura 4.3.1, vê-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Nota-se também que as respostas experimentais para a atividade enzimática apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 4.3.2, obteve-se a seguinte equação (Eq. 4.2):

$$\text{Atividade enzimática} = 2,926204 + 0,618052 X_2 + 0,126671 X_3 - 0,196250 X_1 X_2 - 0,946852 X_1 X_3 + 0,114302 X_3 X_3 \quad (4.2)$$

Analisando esta equação, pode-se observar pelos coeficientes das variáveis X_2 e X_3 que a concentração de AMM influenciou significativamente a atividade enzimática. Este fato pode ser confirmado pela comparação dos resultados dos experimentos 1 e 3; 5 e 3; 5 e 7; 6 e 8, em que as concentrações de AMM aumentam de 3,11 para 17,11 g/L mantendo a concentração de K_2HPO_4 constante, houve aumento da atividade enzimática de 23,58%; 24,05%; 26,57%; e 9,17% respectivamente. Já a comparação dos experimentos 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 6 e 7, em que as concentrações de AMM são constantes, mas as concentrações de K_2HPO_4 aumentam de 15 para 25 g/L, houve aumento da atividade enzimática de 113,01%; 45,42%; 60,14%; 38,12%, respectivamente.

Pirollo e Contiero (2001) relataram que concentrações de sacarose acima de 60 g/L inibem a concentração celular e a produção da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) à 26°C, 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,7.

Chellapandian, Larios *et al.* (1998) ao estudarem o efeito da concentração da sacarose na taxa de reação inicial observaram que a enzima exibe um comportamento cinético do tipo Michaelis-Menten com inibição em concentrações em concentrações altas de sacarose (acima de 50 g/L).

Rodrigues, Lona e Franco (2003) relataram em seu estudo com *Leuconostoc mesenteroides* F 512 F que o aumento da concentração de fosfato além de manter o pH evitando a desnaturação da enzima, favoreceu a produção da enzima na ordem de 3 vezes a obtida com meio padrão.

Stacey (1942), Hehre, (1941) e Tsuchiya, Koepsell et al. (1952) estudaram os efeitos da concentração de sacarose, AMM e K_2HPO_4 na produção de dextrana por culturas usando altas concentrações de sacarose. Eles otimizaram a composição dos ingredientes e recomendaram concentração de 2% de cada um dos três componentes para a produção da dextranasacarase.

O modelo utilizado no presente estudo foi altamente significativo, sendo possível construir as superfícies de respostas (Figura 4.3.2) e definir as regiões de interesse, como forma de ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática da dextranasacarase. As variáveis duas a duas foram relacionadas com a produção de enzima.

O mais interessante num estudo deste tipo, usando DCCR é a qualidade da informação que o pesquisador pode obter do processo, sendo possível definir quais são as faixas mais adequadas para cada resposta desejada.

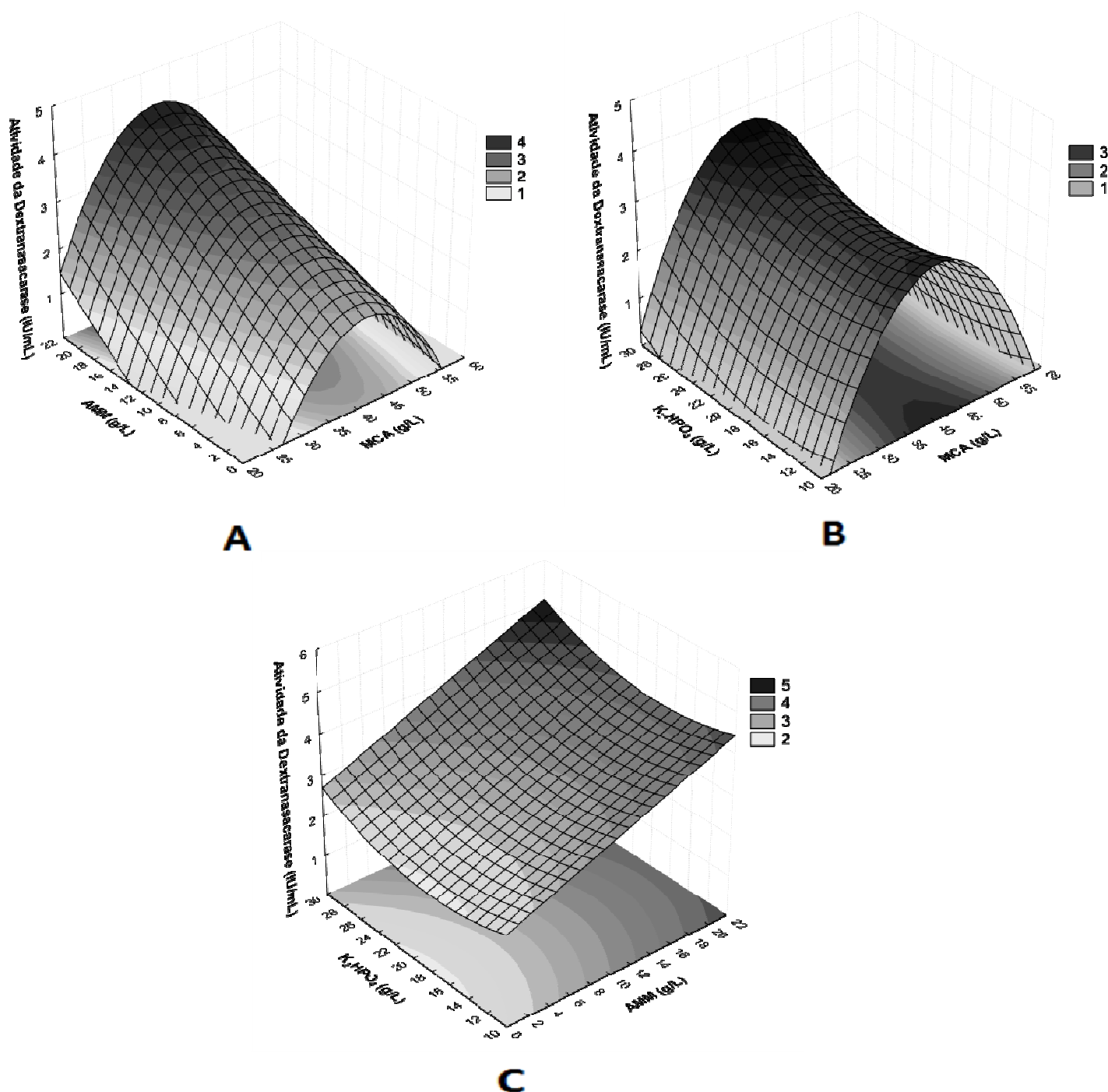


Figura 4.3.2 – Superfícies de resposta para a atividade enzimática como função da concentração de (A) AMM e MCA; (B) K_2HPO_4 e MCA; (C) K_2HPO_4 e AMM

A figura 4.3.2(A) mostra que para valores de concentração de AMM acima do ponto central (16-21,77 g/L) e para valores de concentração de MCA próximo ao ponto central (32-44 g/L), há aumento da atividade enzimática.

A figura 4.3.2(B) mostra que para valores de concentração de K_2HPO_4 acima do ponto central (26-30 g/L) e para valores de concentração de MCA próximo ao ponto central (32-44 g/L), há aumento da atividade enzimática.

A figura 4.3.2(C) confirma as tendências observadas nas figuras A e B, nas quais a atividade enzimática é aumentada quando valores de concentrações de K_2HPO_4 e AMM estão acima do ponto central e quando a concentração de MCA está próximo ao ponto central.

4.3.2. Otimização do meio de cultura por DCCR - Concentração celular

A tabela 4.3.3 apresenta a média das respostas obtidas, em cada tempo de fermentação, e seus respectivos desvios padrões, que representam a variabilidade estatística da concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, para cada DCCR.

Tabela 4.3.3 – Resultados médios e desvios padrões da concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, em mg/mL, obtidos durante a realização dos experimentos, segundo as concentrações das variáveis (MCA, AMM e K_2HPO_4) estabelecidos pelo planejamento experimental.

EXP.	Concentração Celular (mg/mL)				
	0 hora	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
1	0,041 ± 0,015	1,322 ± 0,159	2,097 ± 0,365	2,485 ± 0,497	3,169 ± 0,525
2	0,106 ± 0,021	1,065 ± 0,204	2,045 ± 0,312	2,932 ± 0,466	3,032 ± 0,542
3	0,342 ± 0,082	2,263 ± 0,422	3,327 ± 0,909	5,067 ± 2,163	5,423 ± 0,670
4	0,305 ± 0,107	1,835 ± 0,355	2,990 ± 0,507	4,729 ± 0,700	5,058 ± 0,749
5	0,139 ± 0,024	1,354 ± 0,224	3,167 ± 0,357	3,671 ± 0,469	4,757 ± 0,669
6	0,038 ± 0,006	1,200 ± 0,178	3,024 ± 0,565	3,461 ± 0,572	3,799 ± 1,149
7	0,311 ± 0,045	2,400 ± 0,514	3,971 ± 1,404	5,450 ± 1,107	6,089 ± 2,368
8	0,184 ± 0,041	1,794 ± 0,260	3,652 ± 0,480	5,012 ± 0,974	5,468 ± 1,020
9	0,221 ± 0,077	1,726 ± 0,286	2,083 ± 1,051	3,671 ± 0,606	4,182 ± 1,119
10	0,310 ± 0,055	2,119 ± 0,366	3,674 ± 0,573	4,903 ± 0,845	5,468 ± 0,715
11	0,102 ± 0,018	0,380 ± 0,052	1,131 ± 0,133	1,846 ± 0,223	1,855 ± 0,343
12	0,467 ± 0,087	1,982 ± 0,376	3,515 ± 0,548	5,386 ± 1,247	6,162 ± 2,260
13	0,192 ± 0,040	2,184 ± 0,590	3,161 ± 1,740	4,766 ± 0,842	4,875 ± 0,966
14	0,182 ± 0,028	1,674 ± 0,336	2,996 ± 0,573	4,127 ± 0,542	4,428 ± 0,682
15	0,239 ± 0,092	1,534 ± 0,338	3,087 ± 1,041	4,593 ± 1,260	4,638 ± 1,704
16	0,295 ± 0,043	1,825 ± 0,302	3,098 ± 0,514	4,291 ± 0,741	4,374 ± 0,749
17	0,309 ± 0,045	1,909 ± 0,313	3,243 ± 0,537	4,416 ± 0,737	4,436 ± 0,274

Pode-se verificar, observando a tabela 4.3.3, que as diferentes concentrações de MCA, de AMM e de K_2HPO_4 resultou em diferença do resultado de 0,038 a 6,16 mg/mL de concentração celular [experimento 6 (0h) e experimento 12 (48h)].

Verifica-se, após a análise da Tabela 4.3.3 que o melhor resultado de concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, em comparação com todas as respostas relatadas, foi obtido no experimento, cujo meio tinha maior concentração de AMM, ou seja, maior concentração da fonte de nitrogênio (Experimento 12, com 48 horas de fermentação).

Comparando o ensaio 11 com o 12, com 48 horas de fermentação, feitos com a menor e a maior concentração de AMM, 0 g/L e 21,77 g/L respectivamente e iguais concentrações de MCA (40 g/L) e de K_2HPO_4 (20 g/L), fica evidente que a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de AMM, tendo sido alcançado valor mínimo em 1,86 mg/mL (exp.11) e valor máximo de 6,16 mg/mL (exp. 12).

O gráfico abaixo (Figura 4.3.3) ilustra os resultados de concentração celular em função do tempo para cada experimento.

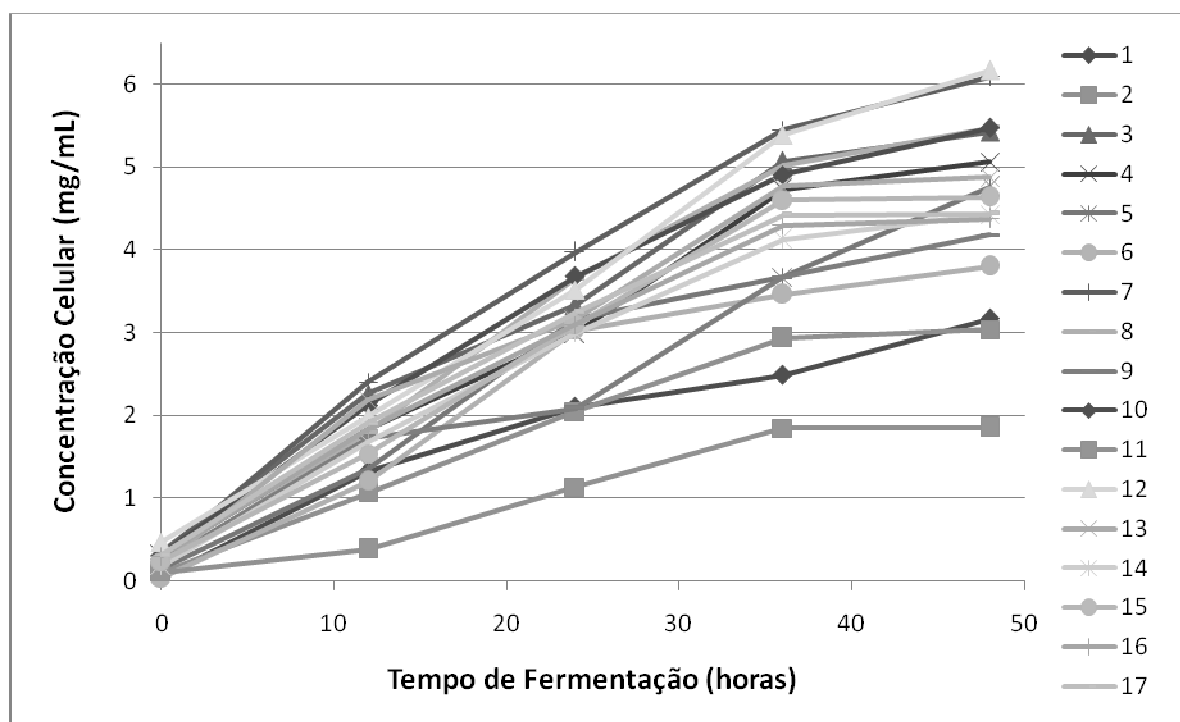


Figura 4.3.3 – Concentração celular média de triplicata dos 17 ensaios com *Leuconostoc mesenteroides* FT045B.

A Figura 4.3.3 mostra que a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045 B aumenta de 0 para 48 horas caracterizando a fase lag seguida da fase log de crescimento da cepa, apesar de que em alguns experimentos (11, 15, 16 e 17) houve menor crescimento entre 36 e 48 horas, caracterizando o início da fase estacionaria da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, fase caracterizada pelo esgotamento dos nutrientes e aumento da quantidade de produtos tóxicos produzidos pelas próprias células, que não apresentam, neste momento, um aumento populacional.

Os resultados obtidos para o melhor tempo de fermentação (48 horas) foram analisados por regressão múltipla, utilizando o programa Statistica 7.1 e considerando como fatores os termos isolados, as interações e os quadráticos das variáveis estudadas. As concentrações celulares preditas e os observados estão relatadas na tabela 4.3.4.

Tabela 4.3.4 – Concentrações preditas e observadas relativos à concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B em cada ensaio do planejamento composto central

EXP.	Me (g/L)	AMM (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	Concentração Celular (mg/mL)	
				Valores observados (mg/mL)	Valores preditos (mg/mL)
1	30,00	3,11	15,00	3,17	3,04
2	30,00	3,11	25,00	3,03	2,87
3	30,00	17,11	15,00	5,42	5,46
4	30,00	17,11	25,00	5,06	5,34
5	50,00	3,11	15,00	4,76	4,31
6	50,00	3,11	25,00	3,80	3,60
7	50,00	17,11	15,00	6,09	6,09
8	50,00	17,11	25,00	5,47	5,44
9	23,20	10,11	20,00	4,18	4,09
10	56,80	10,11	20,00	4,90	5,23
11	40,00	0,00	20,00	1,85	2,33
12	40,00	21,77	20,00	6,16	5,91
13	40,00	10,11	11,59	4,88	5,12
14	40,00	10,11	28,41	4,43	4,42
15	40,00	10,11	20,00	4,59	4,45
16	40,00	10,11	20,00	4,37	4,45
17	40,00	10,11	20,00	4,44	4,45

Os resultados apresentados na Tabela 4.3.4 mostram que a massa celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B foi máximo no ensaio 12 em que a concentração de AMM foi máxima. O ponto central do planejamento, experimentos 15, 16 e 17, não apresenta a maior concentração celular, portanto o ponto máximo na otimização dessa variável não foi próximo às condições centrais do planejamento.

A Figura 4.3.4 mostra o gráfico de concentrações celulares preditas em função das observadas. Observa-se que os valores observados ficaram distribuídos próximos dos preditos ($r = 98359$), levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

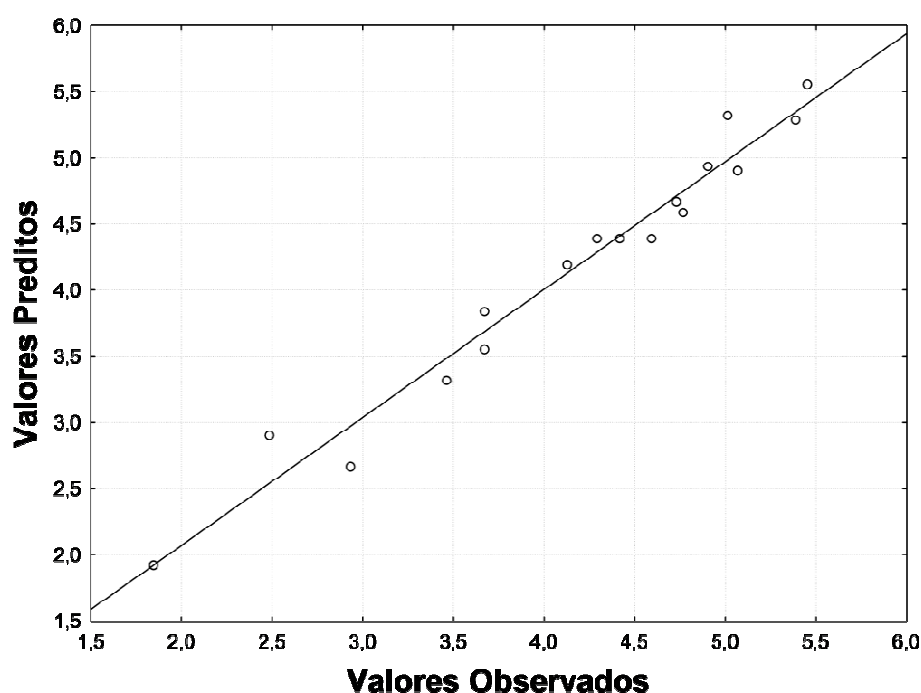


Figura 4.3.6 – Concentrações celulares preditas da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, em mg/mL, versus obtidas através do Planejamento composto Central.

A partir da regressão múltipla, a seguinte equação geral (4.3) foi obtida para a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B:

$$\begin{aligned} \text{Concentração Celular} = & 4.433057 + 0.326175 X_1 + 1.000884 X_2 - 0.118086 X_3 - \\ & 0.131155 X_1 X_2 - 0.094659 X_1 X_3 - 0.126593 X_2 X_3 - 0.050932 (X_1)^2 - 0.288531 (X_2)^2 + \\ & 0.005640 (X_3)^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

A Tabela 4.3.5 apresenta a regressão múltipla, com o coeficiente de determinação (R^2), os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B para a equação geral. Já a tabela 4.3.6 apresenta a ANOVA para a resposta concentração celular.

Tabela 4.3.5 - Resultados da regressão para concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

Fator Codificado	Variável	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	4,4331	48,4010	0,0000
X_1	MCA	0,3262	7,5790	0,0001
X_2	AMM	1,0009	23,2565	0,0000
X_3	K_2HPO_4	-0,1181	-2,7439	0,0288
X_1X_2	MCA/AMM	-0,1312	-2,3335	0,0523
X_1X_3	MCA/ K_2HPO_4	-0,0947	-1,6842	0,1360
X_2X_3	AMM/ K_2HPO_4	-0,1266	-2,2523	0,0590
X_1X_1	MCA/MCA	-0,0509	-1,0742	0,3184
X_2X_2	AMM/AMM	-0,2885	-6,0855	0,0005
X_3X_3	K_2HPO_4/K_2HPO_4	0,0056	0,1190	0,9087
R= 0,994; $R^2= 0,989$; F(9,7)=73,368; Ft = 3,68				

Tabela 4.3.6 – ANOVA para a resposta atividade enzimática

	SS	df	MS	F	p
(1)MCA (g/L)(L)	1,5149	1,0000	1,5149	33,1371	0,0007
MCA (g/L)(Q)	0,0015	1,0000	0,0015	0,0330	0,8610
(2)AMM (g/L)(L)	14,3040	1,0000	14,3040	312,8902	0,0000
AMM (g/L)(Q)	0,6559	1,0000	0,6559	14,3481	0,0068
(3) K_2HPO_4 (g/L)(L)	0,1619	1,0000	0,1619	3,5424	0,1018
K_2HPO_4 (g/L)(Q)	0,0227	1,0000	0,0227	0,4960	0,5040
1L por 2L	0,1269	1,0000	0,1269	2,7767	0,1396
1L por 3L	0,0717	1,0000	0,0717	1,5680	0,2507
2L por 3L	0,1436	1,0000	0,1436	3,1405	0,1197
Erro	0,3200	7,0000	0,0457		
Total SS	16,8645	16,0000			

Foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 5%, sendo desprezadas as interações X_1X_2 (MCA/AMM), X_1X_3 (MCA/ K_2HPO_4) e X_2X_3 (AMM/ K_2HPO_4) e as interações quadráticas $(X_1)^2$ e $(X_3)^2$ (K_2HPO_4/K_2HPO_4).

A Tabela 4.3.7 apresenta o coeficiente de determinação (R^2), os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B para a equação ajustada.

Tabela 4.3.7 - Resultados da regressão para a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B para a equação ajustada.

Fator Codificado	Variável	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	0,0785	55,8871	0,0000
X_1	MCA	0,0645	5,0531	0,0002
X_2	AMM	0,0645	15,5058	0,0000
X_2X_2	AMM/AMM	0,0662	-4,2041	0,0010
R= 0,978 R ² = 0,956; F(3,13)= 94,546; Ft = 3,41				

A tabela 4.3.7 mostra que as variáveis concentração de MCA e AMM influenciam no rendimento celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B.

O resultado de F calculado (Fc) foi superior ao F tabelado (Ft) para um nível de significância de 5%. Pode-se então rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, o que significa 95% de confiança que o modelo é significativo.

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,95 indica ajuste adequado dos dados experimentais para a resposta de atividade enzimática, frente à equação empírica proposta, ou seja, 95% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo ajustado.

Para visualizar com maior facilidade o efeito das variáveis independentes (concentração de MCA, AMM e de K_2HPO_4 sobre a concentração celular da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, foram construídas as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.3.6).

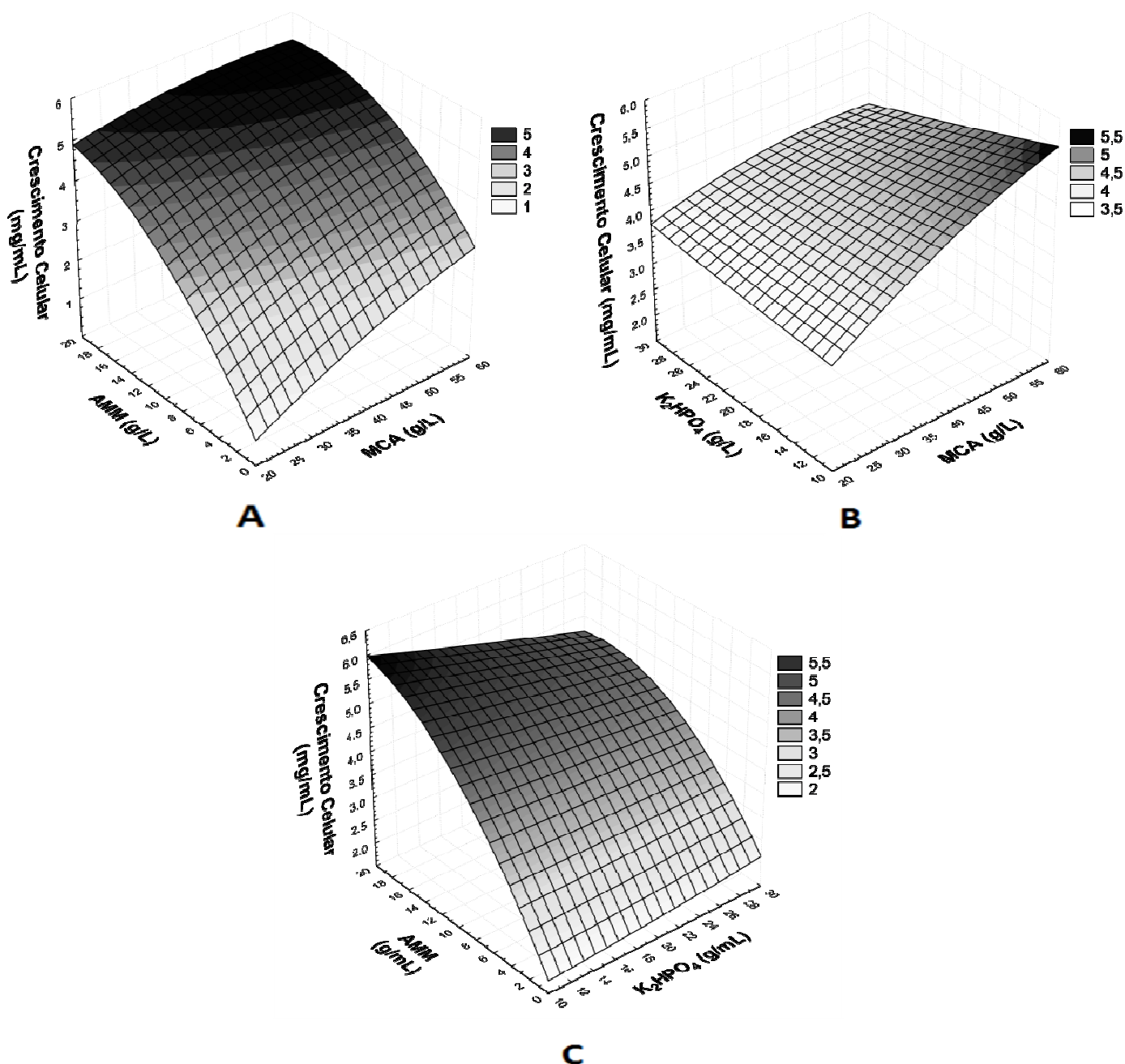


Figura 4.3.6 - Superfície de resposta e curvas de contorno para a concentração celular da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B (A) em função da concentração de MCA e da concentração de AMM, (B) em função da concentração de K₂HPO₄ e MCA, (C) em função da concentração de AMM e K₂HPO₄.

Analisando-se as superfícies de resposta e as curvas de contorno (Figura 4.3.6), verifica-se uma tendência ao aumento da concentração celular com o aumento da concentração de AMM, com maiores resultados obtidos na faixa de 11 a 21,77 g/L; observa-se também que para menores concentrações de K₂HPO₄ (faixa de 20 a 10 g/L), há aumento da concentração celular. Quando analisamos o efeito

da concentração de MCA, verificamos uma tendência de aumento da concentração celular com concentrações maiores desta variável, geralmente quando a concentração desta está acima de 50 g/L.

O aumento da concentração de AMM e de MCA a diminuição da concentração de K_2HPO_4 ; promoveu o aumento da concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Este comportamento pode ser visualizado pelos gráficos e pela análise da equação 4.3.4.

Comparando as concentrações das variáveis para obtenção das respostas (atividade enzimática e concentração celular) pode-se verificar que existe relações inversas entre as condições e as diferentes respostas, ou seja, para concentrações maiores de K_2HPO_4 , obtemos melhores resultados de atividade enzimática, contudo para menores concentrações de K_2HPO_4 , obtém as maiores concentrações celulares. Esta divergência das condições com relação às respostas também foi observada por Cortezi, Monti e Contiero (2005), que ao estudarem o efeito de diferentes temperaturas na produção de dextranasacarase utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), observaram que a temperatura de 31°C, a qual promovia um decréscimo na produção enzimática, proporcionava aumento da concentração celular.

4.3.3. Consumo de Substrato e pH

Assim como a atividade enzimática e a concentração celular foram medidos durante cada experimento, o consumo de substrato e o pH também foram obtidos em cada tempo de fermentação. As Tabelas 4.3.8 e 4.3.9 mostram os resultados médios e seus respectivos desvios padrões obtidos pela análise de quantificação de sacarose (em g/L) e da medição do pH, ambas em triplicata.

Tabela 4.3.8 – Concentrações médias e desvios padrões de sacarose (em g/L), obtidos durante a realização dos experimentos, segundo as concentrações das variáveis MCA, AMM e K_2HPO_4 estabelecidas pelo planejamento experimental.

EXP	Sacarose (g/L)				
	0 hora	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
1	167,759 ± 27,936	104,487 ± 19,819	4,726 ± 3,212	2,931 ± 1,235	1,775 ± 1,164
2	123,974 ± 26,170	89,424 ± 15,177	1,717 ± 1,164	0,921 ± 0,970	0,573 ± 0,534
3	164,811 ± 28,919	41,672 ± 9,592	3,071 ± 1,361	1,799 ± 1,210	0,744 ± 0,847
4	166,262 ± 24,720	68,146 ± 12,663	4,041 ± 1,666	2,443 ± 1,139	1,560 ± 0,774
5	194,939 ± 28,276	98,258 ± 16,184	6,775 ± 1,897	4,275 ± 1,125	4,356 ± 1,014
6	162,634 ± 23,714	104,066 ± 17,917	3,812 ± 2,680	2,181 ± 1,245	1,463 ± 1,086
7	172,114 ± 16,023	124,064 ± 19,523	7,009 ± 2,034	4,751 ± 1,538	1,763 ± 0,842
8	195,905 ± 12,665	115,973 ± 18,672	10,119 ± 2,494	6,135 ± 1,439	3,538 ± 0,920
9	144,509 ± 25,315	18,469 ± 6,017	0,852 ± 0,827	0,414 ± 0,522	0,272 ± 0,363
10	193,544 ± 29,156	125,774 ± 18,566	3,979 ± 1,245	1,483 ± 1,577	0,996 ± 1,052
11	177,100 ± 29,622	105,232 ± 20,535	79,182 ± 16,097	52,165 ± 8,368	37,732 ± 6,281
12	173,475 ± 32,647	61,395 ± 10,238	5,428 ± 1,561	4,004 ± 1,279	1,664 ± 0,819
13	142,545 ± 26,401	71,201 ± 15,537	7,835 ± 1,854	4,982 ± 0,841	3,120 ± 0,952
14	152,557 ± 29,975	103,345 ± 20,855	15,147 ± 4,207	12,761 ± 2,529	3,005 ± 1,292
15	155,602 ± 14,265	88,757 ± 18,303	6,010 ± 1,793	4,510 ± 1,705	3,144 ± 0,837
16	144,224 ± 24,823	106,775 ± 19,290	4,804 ± 1,545	5,022 ± 1,239	2,437 ± 1,267
17	131,222 ± 0,318	95,110 ± 0,318	1,415 ± 0,360	2,803 ± 1,142	2,838 ± 0,300

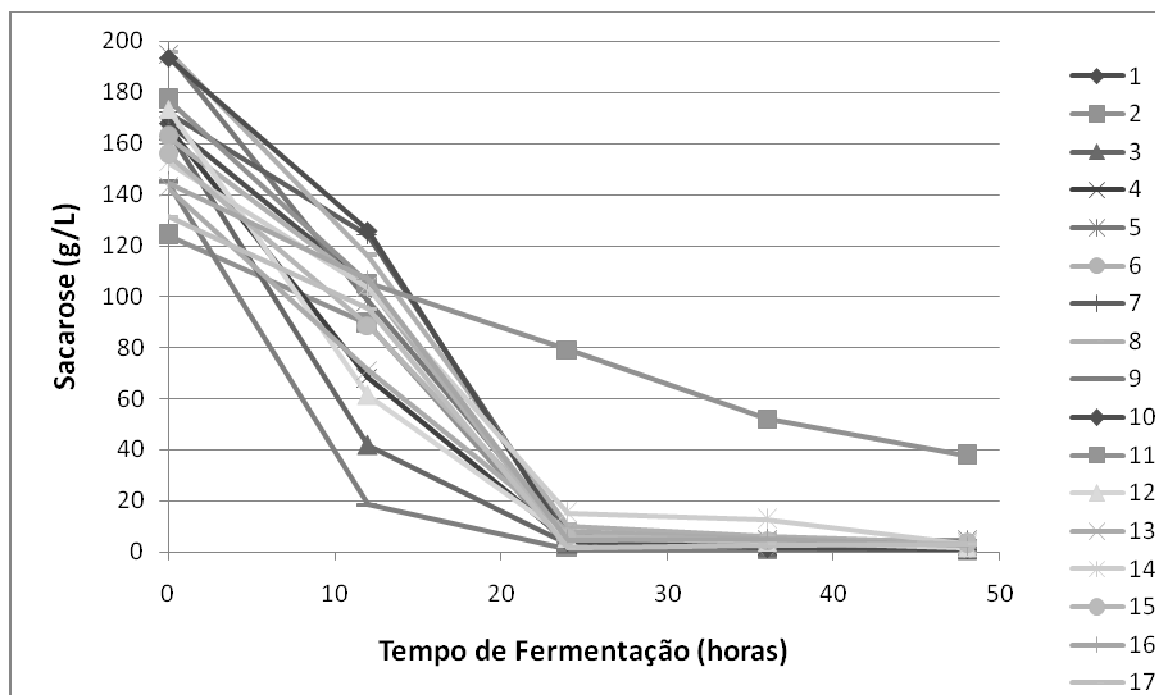


Figura 4.3.7 – Efeito do tempo de fermentação 0, 12, 24, 36 e 48 horas na concentração de sacarose, em g/L, média em triplicata dos 17 ensaios.

Observando a Figura 4.3.7 fica nítido o decréscimo acentuado da concentração de sacarose entre os tempos de fermentação de 0 e 24 horas (houve queda de cerca de 45% da concentração inicial de sacarose entre 0 e 12 horas de fermentação, seguido de queda de 96,7% em média, de 0 a 24 horas), após 24 horas, como restavam, em média apenas 3,3% da concentração inicial de sacarose, o decréscimo foi menos proeminente nos tempos seguintes até o final da fermentação (concentração média final de sacarose 1,3%).

Destes valores médios de porcentagem da concentração de sacarose apresentados estão excluídos os resultados referentes ao experimento 11, que se mostrou bastante discrepante dos demais (em 12 horas apresentou 59,4% da concentração inicial de sacarose; em 24 horas 44,71%; em 36 horas 29,46% e em 48 horas 21,30%). Isto pode ser explicado pelo fato de que este mesmo ensaio apresentou a menor concentração celular e a menor atividade enzimática, consumindo, portanto, menor quantidade de substrato.

Como foi relatado anteriormente, em 24 horas a bactéria foi capaz de atingir sua maior produção de enzima como o mecanismo de ação da enzima dextranasacarase para a produção da dextrana, requer moléculas de sacarose, fica claro o consumo bastante expressivo deste substrato.

Tabela 4.3.10 – Resultados médios e desvios padrões do pH do meio de cultivo obtidos durante a realização dos experimentos, em função das concentrações de MCA, AMM e K_2HPO_4 estabelecidas no planejamento experimental.

EXP.	pH				
	0 hora	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
1	7,53 ± 0,03	6,79 ± 0,26	6,94 ± 0,13	6,85 ± 0,11	6,87 ± 0,17
2	7,82 ± 0,05	7,12 ± 0,24	6,91 ± 0,30	7,16 ± 0,06	7,10 ± 0,10
3	7,26 ± 0,05	6,56 ± 0,08	6,84 ± 0,30	6,79 ± 0,32	6,69 ± 0,33
4	7,46 ± 0,08	6,82 ± 0,24	6,73 ± 0,55	6,96 ± 0,24	6,93 ± 0,29
5	7,49 ± 0,06	7,08 ± 0,52	6,55 ± 0,33	7,01 ± 0,05	6,78 ± 0,18
6	7,73 ± 0,04	6,72 ± 0,07	6,56 ± 0,40	7,01 ± 0,15	7,05 ± 0,15
7	7,20 ± 0,03	6,71 ± 0,32	6,24 ± 0,74	6,44 ± 0,48	6,43 ± 0,49
8	7,46 ± 0,04	6,95 ± 0,36	6,69 ± 0,49	6,85 ± 0,28	6,80 ± 0,37
9	7,52 ± 0,04	7,24 ± 0,32	6,92 ± 0,36	7,11 ± 0,19	7,11 ± 0,19
10	7,41 ± 0,02	6,66 ± 0,11	6,65 ± 0,46	6,72 ± 0,30	6,71 ± 0,34
11	7,85 ± 0,08	7,19 ± 0,06	6,76 ± 0,31	7,09 ± 0,10	6,95 ± 0,09
12	7,28 ± 0,04	6,75 ± 0,24	6,61 ± 0,49	6,73 ± 0,36	6,64 ± 0,40
13	7,15 ± 0,61	6,79 ± 0,63	6,05 ± 0,97	6,20 ± 0,76	6,25 ± 0,71
14	7,66 ± 0,01	7,06 ± 0,33	6,82 ± 0,46	6,91 ± 0,31	7,05 ± 0,20
15	7,44 ± 0,02	6,82 ± 0,02	6,69 ± 0,46	6,92 ± 0,17	6,84 ± 0,24
16	7,47 ± 0,03	6,94 ± 0,66	6,98 ± 0,33	6,92 ± 0,26	6,80 ± 0,33
17	7,60 ± 0,11	6,94 ± 0,16	4,80 ± 3,63	7,14 ± 0,18	7,06 ± 0,24

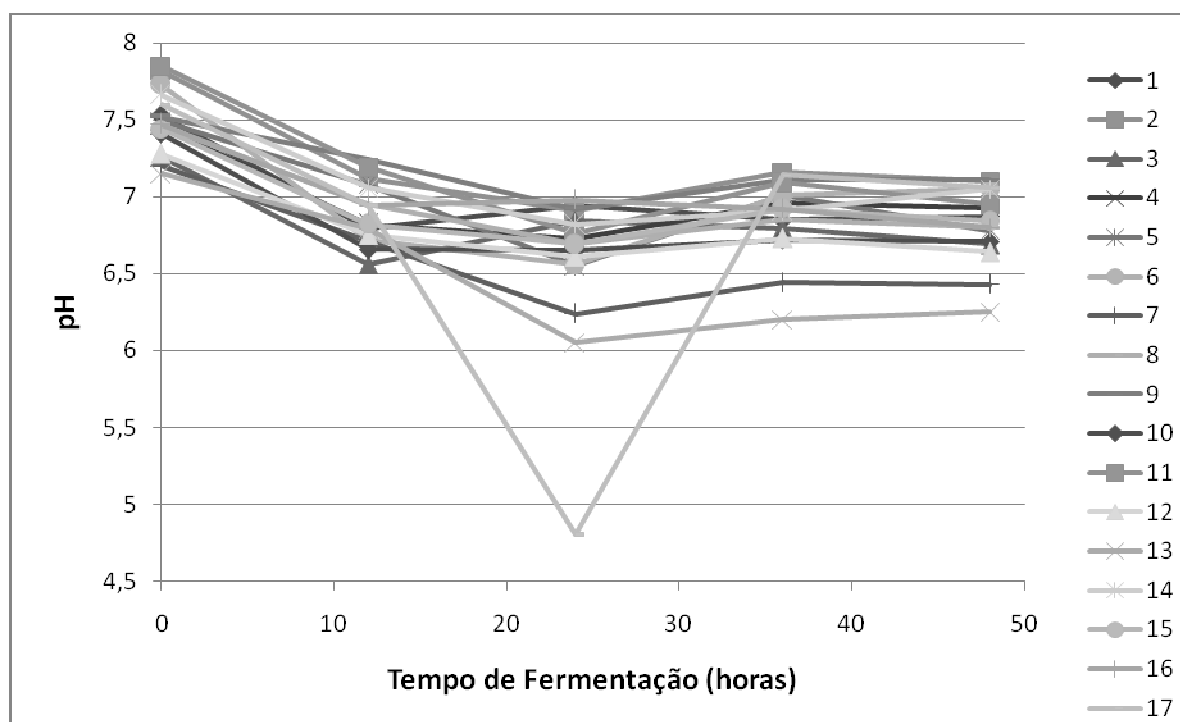


Figura 4.3.8 – Média de triplicatas do pH dos meios de cultura dos 17 ensaios usando *Leuconostoc mesenteroides* FT045B

Observando a Tabela 4.3.10, pode-se concluir que todas as fermentações, após 12 horas de cultivo apresentaram pH entre 7,14 e 6,05, com exceção do experimento 2, que com 36 horas de fermentação apresentou pH 7,16, o experimento 11 com 12 horas de fermentação (pH 7,19) e o experimento 9 também com 12 horas de fermentação (pH 7,24).

Este decréscimo do pH (7,85 a 6,05) do meio de cultivo pode ser explicado pela produção de ácidos e outros subprodutos que são excretados pelo micro-organismo durante a fermentação. Este fato também foi observado por Contiero, Cortezi *et al.* (2006).

Veljkovic, Lazic *et al.* (1992) relataram que o pH do meio de cultura, inicialmente em 7,0 decrescia para 4,2 ou 4,3 durante a fermentação. A fermentação foi feita sem controle de pH e iniciando com pH 7,0. Embora houvesse alta fermentação. A maior produção da enzima ocorreu quando o pH atingiu 6,9 e continuou até pH 6,0.

Tsuchiya, Koepsell *et al.* (1952) fizeram experimentos com controle de pH, sendo que foram testadas fermentações com pH de 6,1, 6,3, 6,7 e $7,0 \pm 0,1$. O máximo rendimento ocorreu em pH 6,7. O pH do meio de cultura, inicialmente em 7,0 decresceu para 4,2 ou 4,3. Quando o pH decresce de 5,0 a 5,5, a enzima é mais ativa e transforma sacarose em dextrana e frutose.

4.4. Otimização da relação taxa de aeração/velocidade de agitação

Os ensaios de determinação das melhores condições de fermentação quanto velocidade de agitação (VA) e taxa de aeração (TA) foram feitos com meio de cultura contendo MCA (23,18 g/L), AMM (20,00 g/L), K_2HPO_4 (20,00 g/L), $CaCl_2$ (0,02 g/L), $MgSO_4$ (0,2 g/L), NaCl (0,01 g/L), $FeSO_4$ (0,01 g/L) e $MnSO_4$ (0,01 g/L) em biorreator e tiveram por objetivo estabelecer diferentes condições de aeração, a serem utilizadas no processo fermentativo para produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B. Além disso, proporcionar maior reprodutibilidade dos dados experimentais em reatores com outras geometrias e outros sistemas de distribuição de ar.

4.4.1. Otimização das condições de cultura por PFC - Atividade Enzimática

Observa-se que 8 horas de fermentação foram necessárias para que fosse obtida a maior atividade enzimática em todas as fermentações realizadas.

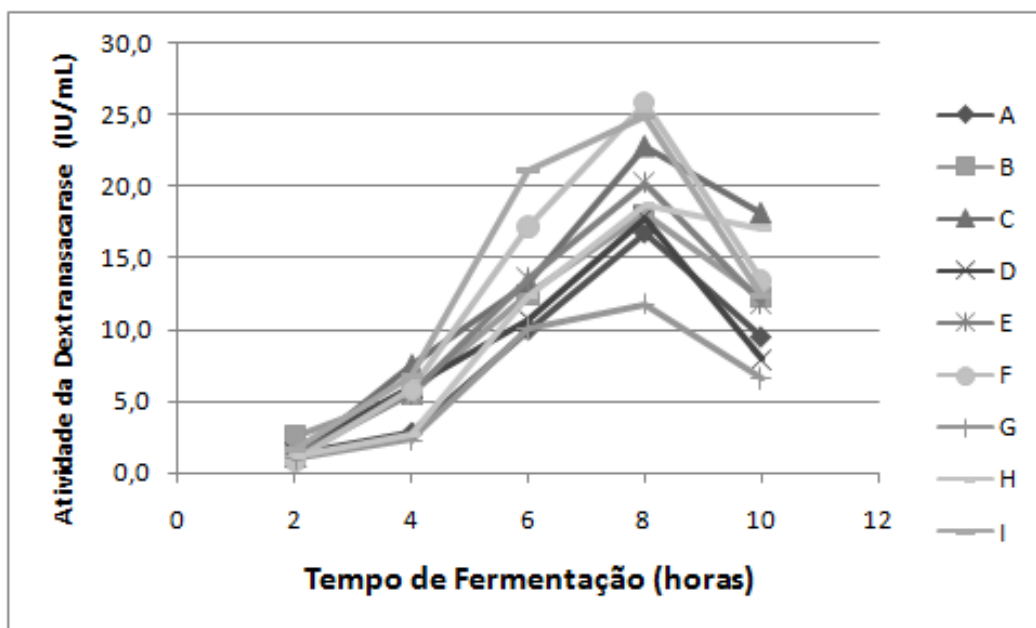


Figura 4.3.9 – Atividade enzimática de dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides* FT045B.

A maior atividade enzimática obtida foi referente ao experimento C, que foi feita com agitação de 100 rpm e aeração de 1 vvm. Nesta etapa foi realizada a otimização das variáveis TA e VA no processo de produção de dextranasacarase.

Os resultados obtidos para o melhor tempo de fermentação (8 horas) foram analisados por regressão múltipla, utilizando o programa Statistica 7.1 e considerando como fatores os termos isolados, as interações e os quadráticos das variáveis estudadas.

A determinação dos parâmetros significativos foi feita através de teste de hipótese utilizando *t* de *Student* com nível de significância de 5%, sendo desconsiderados, para os resultados obtidos: atividade enzimática e concentração celular, os parâmetros que apresentam nível de significância maior que este valor. O coeficiente de correlação quadrático R^2 também foi utilizado para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo ajustado.

A tabela abaixo (Tabela 4.3.12) mostra as atividades previstas e as obtidas de dextranasacarase.

Tabela 4.3.12 – Resultados preditos e observados relativos à atividade enzimática da dextranasacarase produzida em cada ensaio do planejamento composto central

EXP.	VA (rpm)	TA (vvm)	Atividade Enzimática (IU/mL)	
			Observados	Preditos
A	100,0	0,0	3,7	3,7
B	100,0	0,5	3,5	3,6
C	100,0	1,0	4,0	4,0
D	150,0	0,0	2,0	2,0
E	150,0	0,5	2,0	1,9
F	150,0	1,0	2,5	2,4
G	200,0	0,0	1,4	1,4
H	200,0	0,5	1,4	1,4
I	200,0	1,0	1,9	2,0

A Figura 4.3.10 mostra o gráfico de atividades preditas em função das observadas. Observa-se que as atividades observadas ficaram distribuídas próximas das preditas (0,99948), levando a uma tendência constante e à distribuição normal das mesmas.

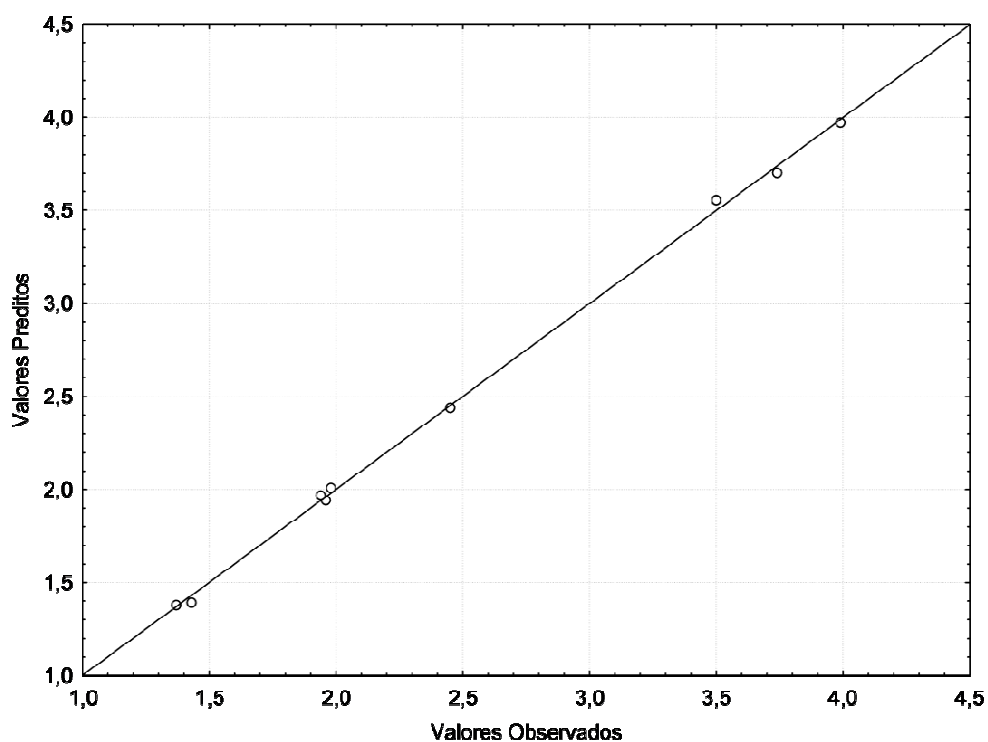


Figura 4.3.10 –Atividade Enzimática (UDS/mL) preditas versus obtidas.

A partir da regressão múltipla feita com base nos resultados relatados e dados do planejamento fatorial completo, a seguinte Equação geral 4.4 foi obtida para a atividade enzimática da dextranasacarase (AE):

$$\text{Atividade Enzimática} = 1,94222 - 1,08167 X_1 + 0,21500 X_2 + 0,53167 X_1^2 + 0,28167 X_2^2 \quad (4.4)$$

As Tabelas 4.3.13 e 4.3.14 apresentam a regressão múltipla e a ANOVA, coeficientes de determinação (R^2) e os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas como resposta à atividade enzimática da dextranasacarase.

Tabela 4.3.13 – ANOVA para a resposta atividade enzimática.

	SS	df	MS	F	p
(1)VA (rpm)(L)	7,02002	1,00000	7,02002	2493,95300	0,00002
VA (rpm)(Q)	0,56534	1,00000	0,56534	200,84400	0,00076
(2) TA (vvm)(L)	0,27735	1,00000	0,27735	98,53200	0,00218
TA (vvm)Q	0,15867	1,00000	0,15867	56,37000	0,00490
1L por 2L	0,02560	1,00000	0,02560	9,09500	0,05695
Erro	0,00844	3,00000	0,00282		
Total SS	8,05542	8,00000			

Tabela 4.3.14 - Resultados da regressão para atividade enzimática da dextranasacarase

Fator Codificado	Variável	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	1,9422	28,2450	0,0000
X_1	VA	-1,0817	-28,7194	0,0000
X_2	TA	0,2150	5,7085	0,0047
X_1X_2	VA/TA	0,5317	8,1501	0,0012
X_1X_1	VA/VA	0,2817	4,3177	0,0125
X_2X_2	TA/TA	1,9422	28,2450	0,0000
R=0,99788462; $R^2=0,99577372$ F(4,4)= 235,61; Ft =6,39				

As tabelas 4.3.13 e 4.3.14 mostram também que as variáveis que influenciam a atividade enzimática são: a TA, além da interação TA/TA, sendo que quanto menor a TA e a interação TA/TA, melhor é a produção de dextranasacarase.

Comparando o F calculado (F_c) e o F tabelado (F_t) para nível de significância de 5% (Tabelas 4.3.14), verifica-se que o primeiro apresentou seu resultado maior que segundo, desta forma, podemos interpretar esta comparação pelo teste de hipótese e rejeitar H_0 e considerar que o modelo é significativo com confiança de 95%.

Logo abaixo (Figura 4.3.11) é possível visualizar a superfície de resposta e a curva de contorno para o efeito das variáveis VA e TA sobre a atividade enzimática da dextranasacarase produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* FT045B.

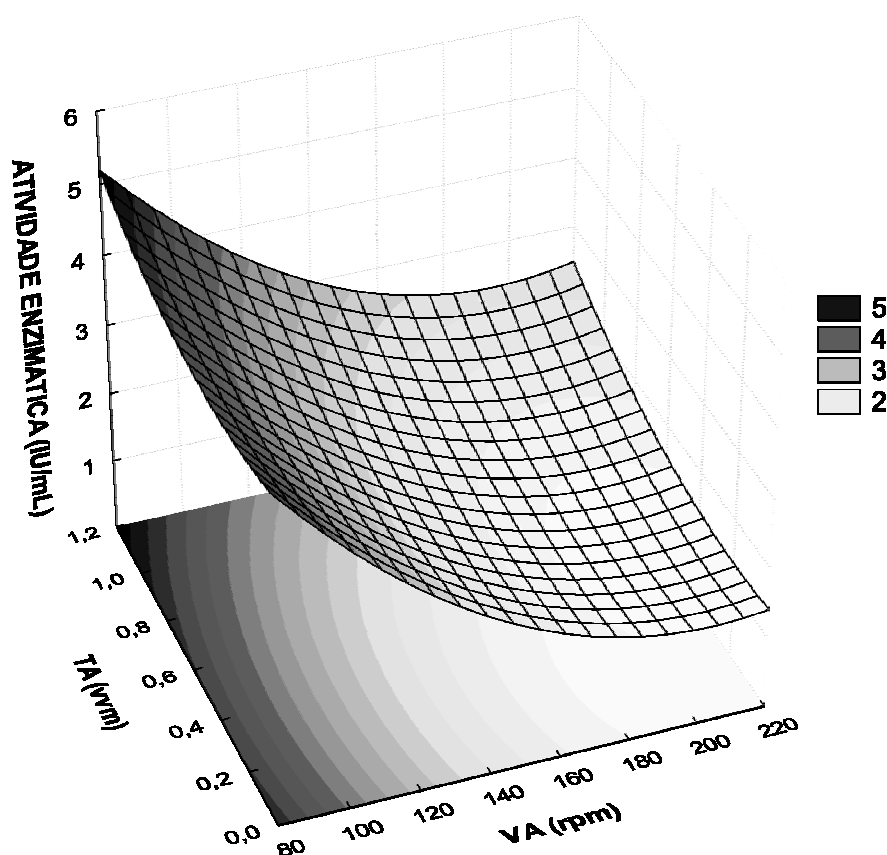


Figura 4.3.11 - Superfície de resposta para a atividade enzimática de dextranasacarase produzida em função da TA e da VA.

A figura 4.3.11 mostra que a máxima produção de dextranasacarase foi obtida com a velocidade de agitação a 100 rpm e taxa de aeração a 1,0 vvm. Também é possível verificar que existe uma região ótima com o aumento da aeração e com a diminuição da agitação. Fica bastante evidente esta região quando se observa a mesma figura, referente a curva de contorno para a atividade enzimática em função da variação da VA e da TA, onde se encontra uma faixa de

combinações de TA (0,8 a 1,0 vvm) e VA (80 a 100 rpm). A partir desta análise, sabe-se qual a variação de VA (± 10 rpm) que pode ser admitida ao redor de 90 rpm (valores ótimos) e TA 1,0 vvm ($\pm 0,2$ vvm) que manterá o processo na condição otimizada.

Barker, Ganetsos e Ajongwhen (1993) avaliaram o efeito da TA (0,17; 2,0; 4,0 e 0 vvm) sobre a produção de dextranasacarase com a cepa NRRL B 512 (F) a 23°C e pH 6,7. Eles constataram que a maior atividade foi atingida com a ausência de TA (23,3 UDS/mL) e a segunda maior atividade com a TA de 1L/minuto (20,1 UDS/mL).

Alsop (1983) constatou que o rendimento da enzima dextranasacarase foi maior sob condições de injeção de ar quando comparado com condições sem aeração ou com aeração de oxigênio puro.

Ao comparar as cepas NRRL B-1299 e NRRL B512F, DOLS *et al.* (1997) verificaram que a manutenção do pH constante e das condições de aeração tiveram pouco efeito no desempenho da cultura e na produção da enzima pela cepa B-1299, quando comparado com outras linhagens. A fermentação não aerada apresentou a produção mais baixa de dextranasacarase. O melhor rendimento da enzima foi obtido com a fermentação aerada com atmosfera de N₂. Este experimento também apresentou o menor crescimento de biomassa. Fermentações bem aeradas apresentaram a maior biomassa e o maior rendimento da dextrana.

Koepsell e Tsuchiya (1952) fizeram testes em laboratório que comprovaram que o rendimento da enzima é invariavelmente mais alto quando a fermentação é conduzida com agitação, quando comparados a fermentações sem agitação.

Ao se comparar os resultados de atividade enzimática obtidos na primeira fase deste trabalho (planejamento composto central) com os resultados obtidos nesta etapa, pode-se constatar que existe um pequeno decréscimo dos resultados da etapa anterior com relação à etapa atual. Isto pode ser explicado pelo fato de que as condições obtidas para a realização da fermentação em frascos Erlenmeyers em shaker são bastante diferentes das condições empregadas no biorreator e devido a estas adaptações a cepa se desenvolve diferentemente, proporcionando produtividade enzimática menor. Alguns estudos demonstraram que fermentações com pH controlado causam diminuição na produção da enzima, como Lazic, Veljkovic *et al.* (1993) e Contiero, Cortezi *et al.* (2006).

Lazic, Veljkovic *et al.* (1993) realizaram fermentação com controle de pH a 6,7 e a 5,5, apresentando os mesmos resultados, mas descobriram que a pH 5,5 e aeração 0,05 vvm, a produção da dextrana é favorecida e o tempo de fermentação é diminuído. Descobriram que a produção da dextrana depende do pH em que se está realizando a fermentação, e que esta produção é maior a pH 5,5 que a 6,7 ou quando o pH não é controlado.

Para explicar este comportamento sugere-se que a dextranasacarase seja mais estável a pH 5,5 e que em pH 6,7; o organismo utiliza tanto a glicose quanto a frutose diminuindo a quantidade de dextrana e de frutose, em comparação ao início da fermentação, sendo que a glicose é mais consumida que a frutose. O mesmo efeito é esperado em pH maiores, no início da fermentação sem controle de pH.

4.4.2. Otimização das condições de cultura por PFC - Concentração celular

Nesta etapa foi feita a otimização das variáveis taxa de aeração e velocidade de agitação no processo de produção de dextranasacarase, como relatado anteriormente, contudo os dados de concentração celular também foram obtidas e analisadas neste tópico.

A Tabela 4.3.15 apresenta a média das respostas obtidas, em cada tempo de fermentação, e seus respectivos desvios padrões, que representam a variabilidade estatística, da concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, para cada experimento fatorial completo.

Tabela 4.3.15 – Resultados médios e desvios padrões da concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, obtidos pela fermentação meio de cultura otimizado, em função das variáveis VA e TA determinadas pelo planejamento fatorial completo.

EXP	Concentração Celular (mg/mL)		
	0 hora	2 horas	4 horas
A	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,001
B	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,005 ± 0,001
C	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,007 ± 0,001
D	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,001
E	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,007 ± 0,001
F	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,001
G	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,001
H	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,001
I	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,007 ± 0,001
EXP	Concentração Celular (mg/mL)		
	6 horas	8 horas	10 horas
A	0,008 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,016 ± 0,002
B	0,012 ± 0,002	0,025 ± 0,003	0,026 ± 0,003
C	0,012 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,016 ± 0,002
D	0,011 ± 0,002	0,023 ± 0,003	0,023 ± 0,003
E	0,012 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,035 ± 0,004
F	0,012 ± 0,002	0,025 ± 0,003	0,027 ± 0,003
G	0,012 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,020 ± 0,002
H	0,013 ± 0,002	0,029 ± 0,003	0,030 ± 0,003
I	0,011 ± 0,002	0,020 ± 0,002	0,020 ± 0,002

Observando a Tabela 4.3.15 é possível verificar que pela combinação das variáveis segundo o planejamento fatorial completo realizado com as variáveis agitação e aeração, houve variação de 0,0005 a 0,0350 mg/mL (experimento E com 0 e com 10 horas de fermentação), sendo esta a maior variação de concentração celular relatada dentre os demais ensaios.

Observa-se também que 10 horas de fermentação foram necessárias para que fosse obtido o maior concentração celular de todas as fermentações, sendo que a concentração celular teve menor aumento entre 8 e 10 horas, representando a fase estacionária da cepa.

Com 8 horas de fermentação, nenhum experimento apresentou concentração menor que 0,0143 mg/mL, sendo que em 0 hora a média de densidade ótica era de 0,0012 mg/mL. Desta forma, comparando-se as médias

iniciais e as médias finais da concentração celular, pode-se concluir que a densidade ótica aumentou aproximadamente 19 vezes em 10 horas de fermentação.

O ponto central do planejamento (experimento E) apresenta o melhor resultado de concentração celular, portanto o ponto máximo na otimização desta variável foi próximo às condições centrais do planejamento.

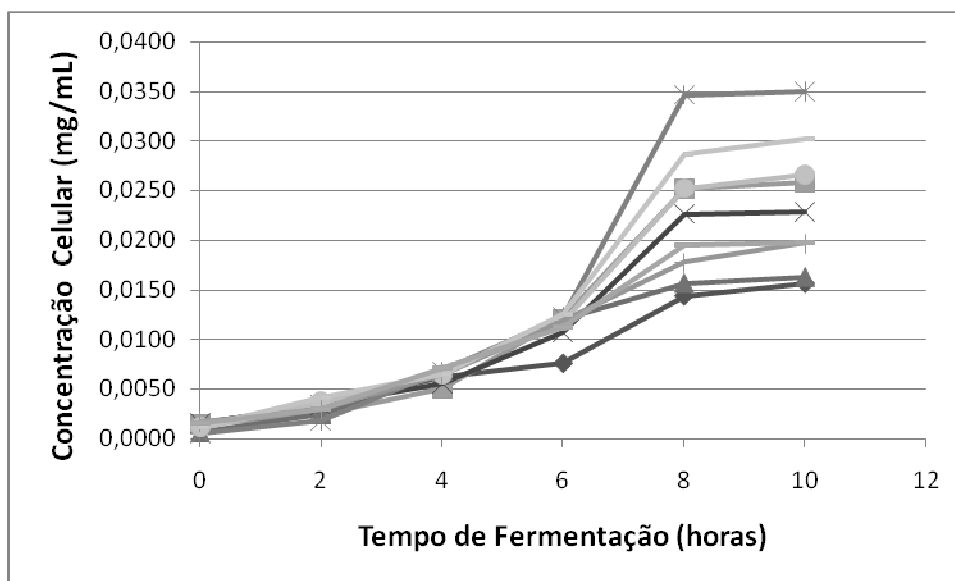


Figura 4.3.12 – Concentração de massa celular de *L. mesenteroides* FT 045B em diferentes condições de cultivo.

O melhor tempo para a produção de massa celular pode ser considerado 8 horas de fermentação, que proporcionou maior aumento do número de células com relação aos demais tempos, caracterizando o ápice da fase log da curva de crescimento. Os resultados obtidos para o melhor tempo de fermentação (8 horas) foram analisados por regressão múltipla, utilizando o programa Statistica 7.1 e considerando como fatores os termos isolados, as interações e os quadráticos das variáveis estudadas.

A determinação dos parâmetros significativos foi feita através de teste de hipótese utilizando uma *t* de *Student* com nível de significância de 5%, sendo desconsiderados, para o resultado obtido de massa celular, os parâmetros que apresentam nível de significância maior que este valor. O coeficiente de correlação quadrático R^2 , também foi utilizado para todas as respostas, a fim de constatar a significância ou não do modelo ajustado.

A tabela abaixo (Tabela 4.3.16) mostra os resultados preditos e os resultados observados para a concentração celular obtidas pelas análises propostas pelo planejamento fatorial completo.

Tabela 4.3.16 – Concentração de massa celular de *L. mesenteroides* FT045B em função da taxa de aeração e velocidade de agitação

EXP.	VA (rpm)	TA (vvm)	Concentração Celular (mg/mL)	
			Observadas	Preditas
A	100,00	0,00	0,0143	0,0141
B	100,00	0,50	0,0251	0,0252
C	100,00	1,00	0,0156	0,0158
D	150,00	0,00	0,0226	0,0231
E	150,00	0,50	0,0347	0,0344
F	150,00	1,00	0,0252	0,0250
G	200,00	0,00	0,0178	0,0175
H	200,00	0,50	0,0287	0,0289
I	200,00	1,00	0,0195	0,0196

Os experimentos que apresentaram maior discrepância entre as concentrações preditas e os observadas foram os realizados com 0,0 vvm de aeração (experimentos G, A e D), já os experimentos B, I e H demonstraram mais coerentes com as concentrações celulares preditas (todas com discrepância menor que 0,6%).

A Figura 4.3.13 mostra o gráfico de resultados preditos em função dos observados. Observa-se que a distribuição dos resultados observados ficaram próximos dos preditos ($r = 0,9991$), levando a uma tendência constante e à distribuição normal dos mesmos.

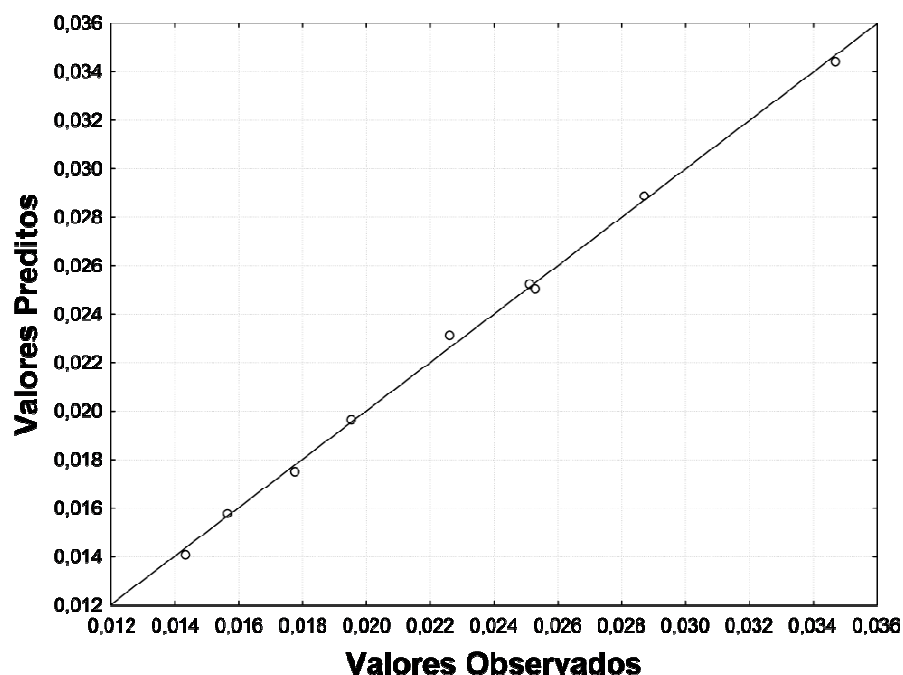


Figura 4.3.13 - Concentração de massa celular de *L. mesenteroides* FT045B em função da taxa de aeração e velocidade de agitação.

A partir da regressão múltipla realizada com base nos resultados observados e nos dados do planejamento fatorial completo, a seguinte equação geral 4.5 foi obtida para a concentração celular (CC):

$$\text{Concentração Celular} = 0,034399 + 0,001815 X_1 + 0,000960 X_2 + 0,000114 X_1 X_2 - 0,007347 X_1^2 - 0,010312 X_2^2 \quad (4.5)$$

As Tabelas 4.3.17 e 4.3.18 apresentam a regressão múltipla e a ANOVA para a resposta concentração celular, com o coeficiente de determinação (R^2), os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta a concentração celular para a equação geral.

Tabela 4.3.17 - Resultados da regressão para concentração celular

Fator Codificado	Variável	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	0,0344	101,0501	0,0000
X_1	Agitação	0,0018	9,7357	0,0023
X_2	Aeração	0,0009	5,1482	0,0142
X_1X_2	Agitação/Aeração	0,0001	0,4994	0,6518
X_1X_1	Agitação/Agitação	-0,0073	-22,7484	0,0002
X_2X_2	Aeração /Aeração	-0,0103	-31,9302	0,0001
R= 0,999; R ² = ,998; F(5,3)=331,71; Ft = 9,01				

Tabela 4.3.18 – ANOVA para a resposta concentração celular

	SS	df	MS	F	p
(1)VA (rpm)(L)	0,00002	1,00000	0,00002	94,78300	0,00230
VA (rpm)(Q)	0,00011	1,00000	0,00011	517,49000	0,00019
(2) TA (vvm)(L)	0,00001	1,00000	0,00001	26,50400	0,01421
TA (vvm)Q	0,00021	1,00000	0,00021	1019,53700	0,00007
1L por 2L	0,00000	1,00000	0,00000	0,24900	0,65181
Erro	0,00000	3,00000	0,00000		
Total SS	0,00035	8,00000			

Foram eliminadas as variáveis com nível de significância superior a 5%, desta forma a interação das variáveis aeração e agitação foi desprezada (X_1X_2).

A Tabela 4.3.19 apresenta o coeficiente de determinação (R^2), os resultados obtidos dos efeitos significativos das variáveis estudadas, e o valor de F da distribuição de Fisher como resposta a concentração celular para a equação ajustada.

Tabela 4.3.19 - Resultados da regressão para a concentração celular

Fator Codificado	Variável	Parâmetro	t de student	Nível de significância
Constante β_0	β_0	0,0344	112,1150	0,0000
X_1	Agitação	0,0018	10,8017	0,0004
X_2	Aeração	0,0010	5,7119	0,0046
X_1X_1	Agitação/Agitação	-0,0073	-25,2393	0,0000
X_2X_2	Aeração /Aeração	-0,0103	-35,4265	0,0000

$R = 0,999$; $R^2 = 0,998$; $F(4,4) = 510,34$; $F_t = 6,39$
--

Pela análise da Tabela 4.3.19 pode-se observar que com o aumento da agitação e da aeração a concentração celular também aumenta, contudo o inverso ocorre com as interações quadráticas X_1^2 e X_2^2 , ou seja, com a diminuição dos valores das interações quadráticas (VA/VA e TA/TA), a concentração celular aumenta.

O valor do F calculado (F_c) é maior que o do F tabelado (F_t) para um nível de significância de 5%, pode-se interpretar esta comparação pelo teste de hipótese e rejeitar H_0 e considerar que o modelo é significativo, com confiança de 95%.

O coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 indica um ajuste adequado dos dados experimentais para a resposta de atividade enzimática, frente à equação empírica proposta, ou seja, 99% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação do modelo ajustado.

Logo abaixo (Figura 4.3.14) é possível visualizar a superfície de resposta e a curva de contorno para o efeito das variáveis agitação e aeração sobre a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B.

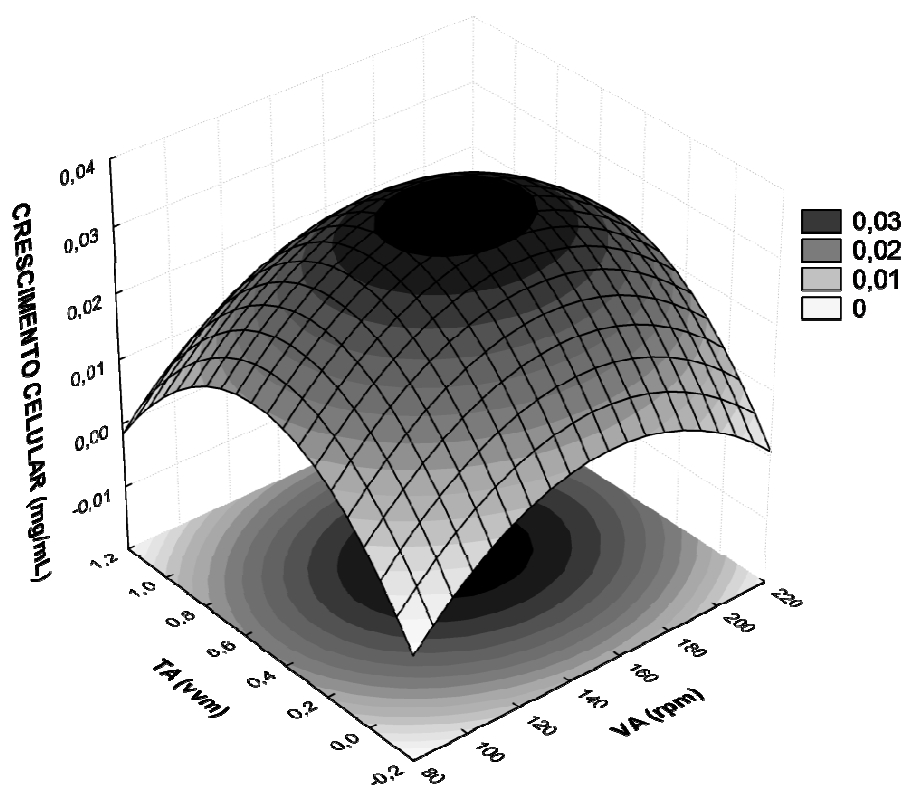


Figura 4.3.14 - Superfície de resposta para a concentração celular da cepa *Leuconostoc mesenteroides* FT045B em função da agitação e da aeração.

Analisando a Figura 4.3.14 pode-se visualizar que existe uma região de maior concentração celular que foi atingida com o aumento da aeração e da agitação. A faixa de combinações de agitação (130 a 180 rpm) e aeração (0,3 a 0,8 vvm) refere-se aos maiores resultados encontrados para a concentração celular, embora estes sejam condições para resultados baixos de atividade enzimática.

Embora neste estudo tenha sido comprovado que a diminuição da aeração induz ao aumento da concentração celular, Johnson e McCleskey (1957) Plihon, Taillandier e Stre Haiano (1995) Lebrun, Junter et al. (1994) consideram que o oxigênio afeta positivamente o crescimento.

4.4.3. Consumo de Substrato

Assim como a atividade enzimática e a concentração celular foram medidos durante cada experimento, o consumo de substrato também foi mensurado em cada tempo de fermentação. A tabela 4.3.20 mostra os resultados médios e seus respectivos desvios padrões obtidos pela realização da análise de quantificação de sacarose (em g/L) em triplicata.

Tabela 4.3.20 – Resultados médios e desvios padrões de sacarose (em g/L), obtidos durante a realização dos experimentos, em função da agitação e aeração estabelecidos por planejamento fatorial completo.

EXP.	Sacarose (g/L)		
	0 hora	2 horas	4 horas
A	153,15 ± 14,86	101,53 ± 9,57	99,53 ± 9,38
B	154,65 ± 13,91	114,85 ± 10,89	112,58 ± 10,67
C	153,35 ± 16,34	128,07 ± 12,22	125,54 ± 11,97
D	154,24 ± 16,41	129,83 ± 12,66	127,27 ± 12,40
E	154,45 ± 13,03	114,54 ± 11,04	112,28 ± 10,82
F	156,42 ± 18,47	85,81 ± 8,10	84,13 ± 7,93
G	153,09 ± 5,52	100,49 ± 9,57	98,51 ± 9,38
H	152,99 ± 12,00	103,40 ± 10,01	101,37 ± 9,81
I	155,07 ± 15,67	98,93 ± 9,42	96,98 ± 9,23

EXP.	Sacarose (g/L)		
	6 horas	8 horas	10 horas
A	66,24 ± 6,19	0,38 ± 0,15	0,11 ± 0,07
B	74,86 ± 7,04	0,27 ± 0,15	0,74 ± 0,37
C	83,41 ± 7,90	2,77 ± 0,15	0,90 ± 0,44
D	84,55 ± 8,19	2,92 ± 0,07	0,53 ± 0,22
E	74,66 ± 7,14	3,29 ± 0,00	0,11 ± 0,07
F	56,08 ± 5,24	3,50 ± 0,15	0,48 ± 0,15
G	65,57 ± 6,19	3,81 ± 0,15	0,69 ± 0,29
H	67,45 ± 6,47	0,58 ± 0,44	0,32 ± 0,22
I	64,56 ± 6,09	4,54 ± 0,29	0,69 ± 0,29

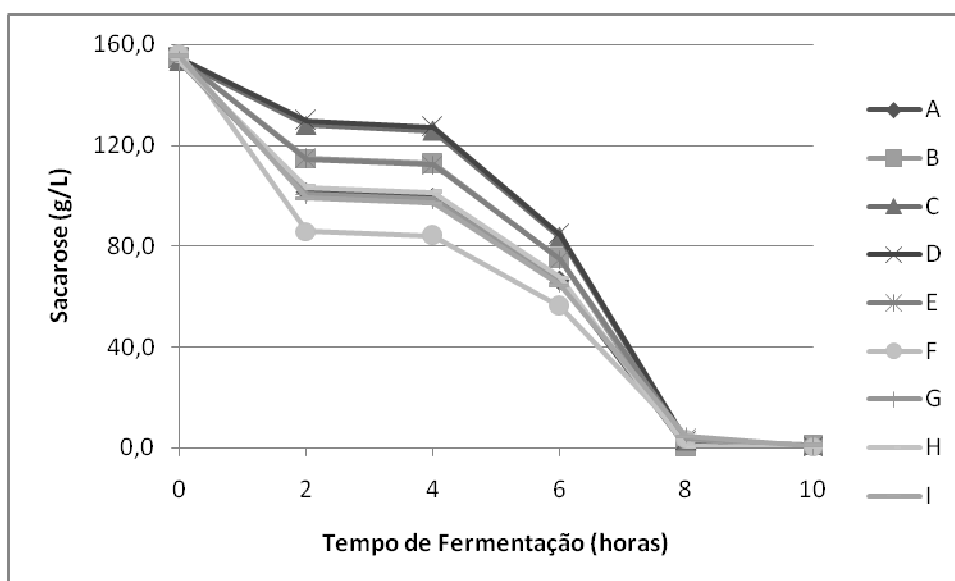


Figura 4.3.15 – Concentração de sacarose nos meios de fermentação em função da taxa de aeração e velocidade de agitação

O gráfico apresentado na Figura 4.3.15 mostra que houve decréscimo acentuado da concentração de sacarose com relação à concentração inicial, entre os tempos de fermentação de 0 a 2 horas (média de 33,9%), de 4 a 6 horas (média de 56,9%) e de 6 a 8 horas (média de 98,5%) sendo que os intervalos de 2 a 4 horas (média 35,2%) e de 8 a 10 horas (média de 99,7%) apresentaram decréscimo bastante próximo do valor encontrado para os respectivos tempos de fermentações anteriores, caracterizando faixas de menor consumo. Isto fica evidente pela análise da Figura 4.3.15, onde é possível ver nestas faixas de tempo, que o gráfico mostra uma linha com concentrações basicamente constantes de sacarose.

5. CONCLUSÕES

A respeito do estudo sobre os métodos de análise da atividade enzimática da dextranasacarase, foi concluído que a medição direta da dextrana após sua precipitação da solução reacional, seguida de reprecipitação (2 vezes) (Métodos I e III) proporciona os resultados mais acurados da quantidade de dextrana sintetizada pela dextranasacarase e, portanto este é o método que deve ser utilizado para obter resultados confiáveis da atividade enzimática da dextranasacarase e para estudos cinéticos.

Também pode-se concluir que o uso de métodos quantificadores dos grupos redutores para determinar a atividade da dextranasacarase e de enzimas relacionadas pela medição dos valores redutores da D-frutose formada, gera resultados altos devido à oxidação da D-frutose e da dextrana. Este é o caso específico dos métodos do DNS e do ferricianeto/arsenomolibdato, ambos na presença ou ausência de dextrana.

Sobre a caracterização do polissacarídeo produzido pelo micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, a massa molar média da dextrana FT045B foi determinada como 91.535,56 Da e o grau de polimerização médio foi de 564,92, ambos determinados pela medição dos valores redutores e dos carboidratos totais. Para assegurar que o polissacarídeo produzido tratava-se de dextrana real, com a cadeia principal formada principalmente de ligações α -1,6-glicopiranosídicas, a dextrana foi hidrolisada com endodextranase produzida por *Penicillium* sp e os produtos principais detectados foram a isomaltose e a isomaltotriose, que representam os produtos da hidrólise das ligações α -(1,6).

Foi encontrado menos de 5% de ligações secundárias, tais como α -(1,3), α -(1,4) ou α -(1,2), uma vez que a hidrólise ocorreu acima de 20-30% da estrutura da dextrana. A reação do receptor com maltose e dextranasacarase FT045B rendeu mais de 20% de panose e 19% de ligações ramificadas (DP4), produtos que são comumente encontrados neste tipo de reação.

A análise dos espectros de FTIR e ^1H RMN confirmou que o polissacarídeo produzido pela *Leuconostoc mesenteroides* FT045B é altamente linear com ligações α -(1,6) e 2,1% de ramificações α -(1,3). A dextrana comercial B512F adquirida da Sigma mostrou resultados muito similares aos obtidos com a nova dextrana FT045B, demonstrando que as estruturas podem ser consideradas idênticas. É bastante importante descobrir novos organismos capazes de produzir dextrana altamente linear.

Conclui-se que na otimização da produção de dextranasacarase, que os resultados mostraram potencialidade na substituição da sacarose e do extrato de levedura por MCA e AMM, respectivamente. As superfícies de resposta demonstraram que os melhores resultados para a atividade da dextranasacarase (4,03 IU/mL) foram obtidos com a faixa otimizada de 16 a 21,77 g/L de AMM, 32 a 44 g/L de MCA e 26 a 28,41 de K_2HPO_4 em 24h de fermentação em termo agitador *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B.

Foi possível verificar que existe uma região ótima com o aumento da aeração e com a diminuição da agitação. Existe uma faixa de combinações de aeração (0,8 a 1,0 vvm) e agitação (80 a 100 rpm), a partir da qual, sabe-se qual a variação de agitação (± 10 rpm) que pode ser admitida ao redor de 90 rpm (valores ótimos) e da taxa de aeração 1,0 vvm ($\pm 0,2$ vvm) que manterá o processo na condição otimizada.

Embora não tenha sido obtido um ponto ótimo de concentração celular em função das variáveis estudadas, verificou-se a tendência ao aumento da concentração celular com o aumento da concentração de AMM, com maiores valores obtidos na faixa de 11 a 21,77 g/L; observou-se que para concentrações menores de K_2HPO_4 (faixa de 12 a 30 g/L), também existe uma tendência ao aumento da concentração celular; e para a concentração de MCA, o aumento da concentração celular com concentrações maiores desta variável, geralmente quando a concentração desta está acima de 50 g/L.

Foi possível visualizar que existe uma região de maior concentração celular que foi atingida com o aumento da aeração e da agitação. A faixa de combinações de agitação (130 a 180 rpm) e aeração (0,3 a 0,8 vvm) refere-se aos maiores resultados encontrados para a concentração celular, embora estas sejam condições para resultados baixos de atividade enzimática .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJONGWEN, N. J.; BARKER, P. E. Scale-up studies of nonaerated fed-batch fermentation of dextransucrase and the industrial synthesis of dextran using the enzymatic route. **J. Chem. Technol.**, 56, 1993. 113-118.
- ALCALDE, M. *et al.* Stability in the presence of organic solvents of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRL B-512F immobilized in calcium-alginate beads. **Prog. Biotechnol**, 15, 1998. 535-540.
- ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. In: BUSHELL, M. E. **Microbial Polysaccharides**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 1-44.
- ARQUEELLO-MORALES, M. *et al.* Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B 512F dextransucrase. **Antonie Leeuwenhoek**, 87, 2005. 131-141.
- ASSIS, A. J. *et al.* Produção de dextranasacarase com *Leuconostoc mesenteroides* por fermentação em batelada alimentada - análise pelo método de superfície de resposta, 2003.
- BAILEY, R. W. *et al.* Immunopolysaccharides. Part VI. The isolation and properties of the dextransucrase of *Betacoccus arabinosaceous*. **J. Chem. Soc.**, 1957, 1957. 3530-3536.
- BARKER, P. E.; AJONGWEN, N. J. The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques. **Biotechnol. Bioeng.**, 37, 1991. 703-707.
- BARKER, P. E.; GANETSOS, G.; AJONGWHEN, N. J. A novel approach to the production of clinical grade dextran. **J. Chem. Techol. Biotechnol**, 57, 1993. 21-26.
- BARKER, S. A. *et al.* Immunopolysaccharides. Part XI. Structure of *Acetobacter capsulatum* dextran. **J. Chem. Soc.**, 4, 1958. 4414-4416.
- BEMILLER, J. N. In: WHISTLER, R. L.; PASCHALL, E. F. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, v. 1, 1965. p. 521.

- BENTRAND, A. *et al.* *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. **Carbohydr. Res.**, 341, 2006. 855-863.
- BOUNE, E. J.; HUSTON, D. H.; WEIGEL, H. The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. **Biochem. J.**, 85, 1962. 158-162.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments, an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley & Sons, v. 537, 1978.
- BOZONNET, S. *et al.* Molecular Characterization of DSR-E, an α -(1,2) Linkage-Synthesizing Dextranase with Two Catalytic Domains. **J. Bacteriol.**, 184, 2002. 5753-5761.
- BRENDA- The Comprehensive Enzyme Information System. **www.brenda-enzymes.org**. Acesso em: 15 jan. 2010.
- BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugar and determining cellulase activity. **Enzyme Microb. Technol.**, 7, 1985. 327-332.
- BROWN, D. E.; MCAVOY, A. A pH controlled fed-batch process for dextranase production. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 48, 1990. 405-414.
- BUCHHOLZ, K.; MONSAN, P. Dextranases. In: WHITAKER, J. R. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2001.
- BULLUM, F. J. Thermal conversion of nonpriming deoxyribonucleic acid to primer. **J. Biol. Chem.**, 234, 1959. 2733-2734.
- CAO, W. *et al.* Structure of antitumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv) Diels. **Carbohydrate Polymers**, 66, 2006. 149-159.
- CHAGAS, C. M. *et al.* Dextranase production using cashew apple juice as substrate; effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioproc. Biosyst. Eng.**, 30, 2007. 207-215.
- CHAMPION, C. *et al.* Design of alpha-transglucosidases of controlled specificity for programmed chemoenzymatic synthesis of antigenic oligosaccharides. **J. Am. Chem. Soc.**, 131, 2009. 7379-7398.
- CHELLAPANDIAN, M. *et al.* Production and properties of a dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from "pulque", a traditional Aztec alcoholic beverage. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 21, 1998. 51-56.

- CHLUDZINSKI, A. M.; GERMAINE, G. R.; SCHACHTELE, C. F. Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, 118, 1974. 1-7.
- CONTIERO, J. *et al.* Dextran synthesis by dextransucrase *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B. **Res. J. Biotechnol**, 1, 2006. 22-27.
- CORTEZI, M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B isolated from alcohol and sugar mill plant. **African Journal of biotechnology**, 4(3), 2005. 279-285.
- CÔTÉ, G. L.; ROBYT, J. F. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes alternating (1-6), (1-3)- α -D-glucan. **Carbohydr. Res.**, 101, 1982. 57-74.
- CÔTÉ, G. L.; ROBYT, J. F. The formation of α - (1 $\rightarrow$ 3) branch linkages by a α -glucansucrase from *Streptococcus mutans* 6715 producing a soluble α -glucan. **Carbohydr. Res.**, 127, 1984. 95-107.
- DE SEGURA, A. G. *et al.* Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Eupergit Supports Biotechnol. Prog.**, 20, 2004A. 1414-1420.
- DE SEGURA, A. G. *et al.* Modulating the Synthesis of Dextran with the Acceptor Reaction Using Native and Encapsulated Dextransucrases. **Technol. Biotechnol.**, 42, 2004B. 337-324.
- DE SEGURA, A. G. *et al.* Synthesis of methyl α -D-glucooligosaccharides by entrapped dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. **J. Biotechnol.**, 124, 2006. 439-445.
- DE SEGURA, G. A. *et al.* Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. **Biocat. Biotransform.**, 21, 2003. 325-331.
- DOLS, M. *et al.* Characterization of the different dextransucrase activities excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64, 1998. 1298-1302.
- DOLS, M. *et al.* Kinetic modeling of oligosaccharide synthesis catalyzed by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. **John Wiley & Sons, Inc.**, 1999.
- DOLS, M.; REMAUD-SIMEON, M.; MONSAN, P. F. Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *Leuconostoc*

- mesenteroides* NRRL B512F. **Enzyme Microb. Technol.**, 20, 1997. 523-530.
- DOLS-LAFARGUE, M. *et al.* Reactor optimization for α -1,2-glucooligosaccharide synthesis by immobilized dextranucrase. **Biotechnol. Bioeng.**, 74, 2001. 498-504.
- EOM, H. J.; SEO, D. M.; HAN, N. S. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* ssp. producing highly active dextranucrase from lactate fermented vegetables. **Int. J. Food Microbiol.**, 117, 2007. 61-67.
- ERHARDT, F. A. *et al.* Co-Immobilization of dextranucrase and dextranase for the facilitated synthesis of isomaltooligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. **Biotechnol. Bioeng.**, 100, 2008. 367-683.
- ERHARDT, F. A.; STAMMEN, S.; JOERDENING, H. J. Production, characterization and co-immobilization of dextranase from *Penicillium aculeatum*. **Biotechnol. Lett.**, 30, 2008. 1069-1073.
- EU Patent. **European Patent Office**, 2010. (Acesso em 19/01/2010).
- FABRE, E. *et al.* Role of the two catalytic domains of DSR-E dextranucrase and their involvement in the formation of highly α -1,2 branched dextran. **J. Bacteriol.**, 187, 2005. 296-303.
- FIGURES, W. R.; EDWARDS, J. R. α -D-Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*; isolation of two forms of the enzyme that bind to insoluble dextran. **Carbohydr. Res.**, 88, 1981. 107-117.
- FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, 195, 1991. 93-96.
- FU, D.; ROBYT, J. F. A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. **Prep. Biochem.**, 20, 1990. 93-106.
- FUKUI, K.; FUKUI, Y.; MORIYAMA, T. Purification and properties of dextranucrase and invertase from *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, 118, 1974. 796-804.
- FUNANE, K. *et al.* Changes in linkage pattern of glucan products induced by substitution of Lys residues in the dextranucrase. **FEBS Lett.**, 579, 2005. 4739-4745.
- GERMAINE, G. R.; CHLUDZINSKI, A. M.; SCHACHTELE, C. F. *Streptococcus mutans* Dextranucrase: Requirement for Primer Dextran. **J. Bacteriol.**, 120, 1974. 287-294.

- GERMAINE, G. R.; SCHACHTELE, C. F.; CHLUDZINSKI, A. M. Rapid Filter Paper Assay for the Dextranase Activity from *Streptococcus mutans*. **J. Dental. Res.**, 53, 1974. 1355-1360.
- GIL, E. C. *et al.* Sugar cane native dextran as an innovative functional excipient for the development of pharmaceutical tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 68, 2008. 319-329.
- GIRARD, E.; LEGOY, M. D. Activity and stability of dextrans from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL R 512 (F) in the presence of organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.**, 24, 1999. 425-432.
- GOULAS, A. K. *et al.* Synthesis of isomaltoligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. **Enzyme Microb. Technol.**, 35, 2004. 327-338.
- GOYAL, A.; KATIYAR, S. S. Effect of certain nutrients on the production of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **J. Basic Microbiol.**, 37, 1997. 197-204.
- GOYAL, A.; KATIYAR, S. S. Studies on the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase by o -phthalaldehyde: evidence for the presence of an essential lysine residue at the active site. **J. Enzyme Inhib.**, 13, 1998.
- GOYAL, A.; TYAGI, D. P.; KATIYAR, S. S. Identification of a single and non-essential cysteine residue in dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, 22, 2007. 111-113.
- GRAHME, D. A.; MAYER, R. M. Purification and comparison of two forms of dextranase from *Streptococcus sanguis*. **Carbohydr. Res.**, 142, 1985. 285-298.
- HEHRE, E. J. Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. **Science**, 93, 1941. 237.
- HEHRE, E. J. Natural synthesis of low molecular weight (clinical type) dextran by a *Streptococcus strain*. **J. Biol. Chem.**, 222, 1956. 739-750.
- HEHRE, E. J.; HAMILTON, D. M. Bacterial conversion of dextrin into a polysaccharide with the serological properties of dextran. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 71, 1949. 336-339.
- HELLMUTH, H. *et al.* Engineering the glucanase GTFR enzyme reaction and glycosidic bond specificity: toward tailor-made polymer and oligosaccharide products. **Biochemistry**, 47, 2008. 6678-6684.

- HESTRIN, S.; AVERINI-SHAPIRO, S.; ASCHNER, M. The enzymic production of levan. **Biochemistry Journal**, 37, 1943. 450-456.
- HUANG, S.; LEE, H. C.; MAYER, R. M. The purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. **Carbohydr. Res.**, 74, 1979. 287-300.
- ILIEV, I. *et al.* Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm28. **J. Appl. Microbiol.**, 104, 2008. 243-250.
- ITAYA, K.; YAMAMOTO, T. Dextransucrase as an enzyme associating with alkaline earth metal ions. **Agr. Biol. Chem.**, 39, 1975. 1187-1192.
- JANE, J.-L.; ROBYT, J. F. Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. **Carbohydrate Research**, 132, 1984. 105-118.
- JEANES, A. Preparation of dextrans from growing *Leuconostoc* cultures. **Methods Carbohydr. Chem.**, 5, 1965. 118-126.
- JEANES, A. *et al.* Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. **Journal American Chemical Society**, 76, 1954. 5041-5052.
- JOHNSON, M. K.; MCCLESKEY, C. S. Studies on the aerobic carbohydrate metabolism of *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Bacteriol**, 74, 1957. 22-25.
- KABOLI, H.; REILLY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotechnol. Bioeng.**, 22, 1980. 1055-1069.
- KANG, H. K.; KIM, Y. M.; KIM, D. M. Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase (DSRBCB4) gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 18, 2008. 1050-1058.
- KILLEY, M.; DIMLER, R. J.; CLUSKEY, J. E. **J. Am. Chem. Soc.**, 77, 1955. 3315-3318.
- KIM, D. *et al.* Dextran molecular size and degree of branching as function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMCM. **Carbohydr. Res.**, 338, 2003. 1183-1189.
- KIM, D.; ROBYT, J. F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. **Enzyme Microb. Technol.**, 16, 1994. 1010-1015.

- KIM, D.; ROBYT, J. F. Properties and uses of dextransucrases elaborated by a new class of *Leuconostoc mesenteroides* mutants. **Prog. Biotechnol.**, 12, 1996. 125-144.
- KIM, M.; DAY, D. F. Optimization of oligosaccharide synthesis from cellobiose by dextransucrase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 148, 2008. 189-198.
- KITAOKA, M.; ROBYT, J. F. Large-scale preparation of highly purified dextransucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. **Enzyme Microbial. Technol.**, 23, 1998. 386-391.
- KITAOKA, M.; ROBYT, J. F. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC dextransucrase: kinetics of the transfer of D-glucose to altose and the effects of enzyme and substrate concentrations. **Carbohydr. Res.**, 320, 1999. 183-191.
- KNAG, H. K. *et al.* Directed evolution of a dextransucrase for increase constitutive activity and the synthesis of a highly branched dextran. **J. Mol. Catal. B.**, 26, 2003. 167-176.
- KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Purification and characterication of two activities of the intracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Biochim. Biophys. Acta**, 397, 1975. 69-79.
- KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. **Biochim. Biophys. Acta**, 614, 1980. 46-62.
- KOBAYASHI, M.; MIHARA, K.; MATSUDA, K. Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: Characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. **Agric. Biol. Chem.**, 50, 1986. 551-556.
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, I.; MATSUDA, K. Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextransucrase evaluated by inhibition kinetics. **Agric. Biol. Chem.**, 50, 1986. 2585-2590.
- KOEPSSELL, H. J. *et al.* **J. Biol. Chem.**, 200, 1953. 793-801.
- KOEPSSELL, H. J.; TSUCHIYA, H. M. Enzymatic synthesis of dextran. **J. Bact**, 63, 1952. 293-295.
- KRALJ, S. *et al.* Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase. **Biochemistry**, 44, 2005. 9206-9216.
- KUBIC, C.; SIKORA, B.; BIELECKI, S. Immobilization of dextransucrase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. **Enzyme Microb. Technol**, 29, 2004. 553-560.

- LANDON, R. S.; WEBB, C. Separation enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. **Process Biocchemistry**, February, 1990. 19-23.
- LAWFORD, G. R. *et al.* Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnol. Bioeng.**, 21, 1979. 1121-1131.
- LAZIC, M. L. *et al.* pH control and the production of extracellular dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 7, 1991. 25-28.
- LAZIC, M. L. *et al.* Effect of pH on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme Microb. Technol.**, 15, 1993. 334-338.
- LEATHERS, T. D. Dextran, in Biopolymers. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. **Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes**. Weinheim: Wiley-VCH, v. 5, 2002. p. 299-321.
- LEBRUN, L. *et al.* Exopolysaccharide production by free and immobilised microbial cultures. **Enzyme Microb. Technol.**, 16, 1994. 1048-1054.
- LEE, M. S. *et al.* Optimized substrate concentration for production of long-chain isomaltooligosaccharides using dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 18, 2008. 1141-1145.
- LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Structural studies on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. **Acta Chem Scand**, 22, 1968. 1907-1912.
- LIU, C. *et al.* Characterization and antitumor activity of polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **Carbohydrate Polymerers**, 67, 2007. 313-318.
- LOPES, A. Production, purification et immobilization de la dextransaccharase de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, Toulouse, 26, 1979.
- LOPEZ, A.; MONSAN, P. Dextran synthesis by immobilized dextransucrase. **Biochimie**, 62, 1980. 323-329.
- LOPEZ-MUNGUA, A. *et al.* Production and Purification of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 Alternansucrase. **Ann. Y. Y. Acad. Sci.**, 613, 1990. 717-722.
- LOPEZ-MUNGUA, A. *et al.* Purified Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 Exists as Single Homogeneous Protein: Analysis by Non-denaturing Native-PAGE. **Enzyme Microb. Technol.**, 15, 1993. 77-85.

- LOPRETTI, M.; MARTINEZ, L. Influence of nitrogen/carbon ratio and complementary sugars on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Process Biochemistry**, 34, 1999. 879-884.
- MAJUMDER, A.; PURAMA, R. K.; GOYAL, A. An overview of purification methods of glycoside hydrolase family 70 dextransucrase. **Ind. J. Microbiol.**, 47, 2007. 197-206.
- MALTEN, M. *et al.* Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. **Biotechnol. Bioeng.**, 89, 2005. 206-218.
- MARTINEZ-ESPINDOLA, J. P.; LOPEZ-MUNGUIA, C. A. The kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactors. **Biotech. Lett.**, 7, 1985. 483-486.
- MAUGERI, F. F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 1a Ed. ed. São Paulo: Edgar Blucher LIDA, v. 3, 2001. p. 12-149.
- MICHIELS, A. G. *et al.* Inhibition of dextransucrase by alpha-d-glucose derivatives. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 31, 1991. 237-246.
- MILLER, A. W.; EKLUND, S. H.; ROBYT, J. F. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydr. Res.**, 147, 1986. 119-133.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F by non ionic detergents, poly(ethylene glycol) and high molecular weight dextran. **Biochim. Biophys. Acta**, 785, 1984. 89-96.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. **Biochim. Biophys. Acta**, 880, 1986. 32-39.
- MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Inhibition of dextransucrase by Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris). **Arch. Biochem. Biophys.**, 248, 1986. 579-586.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31, 1959. 426-428.
- MONCHOIS, V. *et al.* Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 48, 1997. 465-472.

- MONCHOIS, V. *et al.* Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64, 1998. 1644-1649.
- MONSAN, P. *et al.* Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Int. Dairy J.**, 11, 2001. 675-685.
- MONSON, P. *et al.* Dextran synthesis using immobilized *Leuconostoc mesenteroides* dextranase. **Meth. Enzymol.**, 136, 1987. 239-254.
- MOULIS, C. *et al.* High-level production and purification of a fully active recombinant dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Microbiol. Lett.**, 261, 2006. 203-210.
- MOULIS, C. *et al.* Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucanases. **J. Biol. Chem.**, 281, 2006. 31254-31267.
- MOULIS, C. *et al.* One-step synthesis of isomaltoligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextranase. **Biocatal. Biotransform.**, 26, 2008. 141-151.
- MUKERJEA, R.; KIM, D.; ROBYT, J. F. Simplified and improved methylation analysis of saccharides using a modified procedure and thin-layer chromatography. **Carbohydr. Res.**, 292, 1996. 11-12.
- NAESSENS, M. *et al.* *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 80, 2005. 845-860.
- NAM, S. H. *et al.* Maximization of dextranase activity expressed in *E. coli* by mutation and its functional characterization. **Biotechnol. Lett.**, 30, 2008. 135-143.
- NEELY, W. B.; NOTT, J. Dextranase: an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochemistry**, 1, 1962. 1136-1140.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method of determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, 153, 1944. 375-381.
- NEUBAUER, H.; BAUCHE, A.; MOLLET, B. Molecular characterization and expression analysis of the dextranase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. **Microbiology**, 149, 2003. 973-982.
- NIGAM, M.; GOYAL, A.; KATIYAR, A. High yield purification of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 by phase partitioning. **Journal of Food Biochemistry**, 30, 2006. 11-20.

- OLVERA, C. *et al.* Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. **Microbiology**, 153, 2007. 3994-4002.
- ONO, K.; NUESSELE, D. W.; SMITH, E. E. Oxidized saccharides as inhibitors of alpha-glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. **Carbohydr. Res.**, 88, 1981. 119-134.
- OTTS, D. R.; DAY, D. F. Dextransucrase secretion in *Leuconostoc mesenteroides* depends on the presence of a transmembrane proton gradient. **J. Bacteriol.**, 170, 1988. 5006-5911.
- PADMANABHAN, P. A.; KIM, D. Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. **Carbohydrate Research**, 337, 2002. 1529-1533.
- PARK, M. R. *et al.* Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextransucrase expressed in *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 11, 2001. 628-635.
- PASTEUR, L. Sur la fermentation visqueuse et la fermentation butyrique. **Bulletin de la Société de Chimie**, 1861. 30-31.
- PHARMACIA.BIOTECH. Dextran 50 years - still going strong. **Downstream**, 24, 1997. 10-13.
- PIROLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 F: Influência da relação carbono/nitrogênio., São Pedro, 1, 2001.
- PLASTICSEUROPE. **The Compelling Facts About Plastics**, 2009. www.plasticseurope.org (Acesso em 29/01/2010).
- PLIHON, F.; TAILLANDIER, P.; STRE HAIANO, P. Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 43, 1995. 117-122.
- PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature**, 183, 1959. 1657-1659.
- PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), Relatório Técnico n.84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de biotecnologia Industrial - LBI/CTPP, São Paulo**, 2006.

- PRADINES, A. *et al.* Enzymatic synthesis of phosphoric monoesters with alkaline phosphatase in reverse hydrolysis conditions. **Enzyme Microb. Technol.**, 13, 1991. 19-23.
- PURAMA, R. K.; GOYAL, A. Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. **Ind. J. Microbiol.**, 2, 2005. 89-101.
- PURAMA, R. K.; GOYAL, A. Identification, effective purification and functional characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **biores. Technol.**, 99, 2008. 3635-3642.
- QUEIRÓZ, J. H. Contribuição ao estudo da dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. **Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas**, 1987. 15-21.
- QUIRASCO, M. *et al.* Induction and transcription studies of the dextranucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, 1999. 5504-5509.
- RAEMAEEKERS, M. H. M.; VANDAMME, E. J. Production of Alternansucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 in batch fermentation with controlled pH and dissolved oxygen. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 69, 1997. 470-478.
- REMAUD, M. *et al.* Characterization of alpha-(1 leads to 3) branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742. **Carbohydr. Chem.**, 11, 1992. 359-378.
- REMAUD-SIMEON, M. *et al.* Production and use of glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing $\alpha(1 \rightarrow 2)$ linkages. **Appl. Biochem. Biotech.**, 44, 1994. 101-117.
- RHEE, S. H.; LEE, C. H. Properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Sikhae. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 1, 1991. 176-181.
- RIBEIRO, E. J.; COUTINHO FILHO, U.; CERIBELLI, E. Estudo cinético da produção de dextrana por dextranasacarase, Uberlândia, 1998. Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Bioquímica.
- RICHARD, G. *et al.* Glucosylation of alpha-butyl and alpha-octyl-D-glucopyranosides by dextranucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Carbohydr. Res.**, 338, 2003. 855-864.

- RICHARD, G. *et al.* A novel family of glucosyl 1,5-anhydro-D-fructose derivatives synthesised by transglucosylation with dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydr. Res.**, 340, 2005. 395-401.
- RICHARDS, G. N.; STREAMER, M. **Carbohydr. Res.**, 62, 1978. 191-196.
- ROBYT, J. F. Dextran. **Encyclopaedia of Polymer Science**. New York: Wiley-VCH, v. 4, 1985. p. 753-767.
- ROBYT, J. F.; EKLUND, S. H. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase. **Carbohydr. Res.**, 121, 1983. 279-286.
- ROBYT, J. F.; MUKERJEA, R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. **Carbohydrate Research**, 251, 1994. 187-202.
- ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. Production, purification and properties of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F. **Carbohydrate Research**, 68, 1979. 95-111.
- ROBYT, J. F.; WHELAN, W. J. Anomalous Reduction of Alkaline 3,5-dinitrosalicylate by oligosaccharides and its bearing on amylase studies. **Biochem. J.**, 95, n. 1, 1965. 10-11.
- ROBYT, J. F.; WHELAN, W. J. Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. **J. Anal. Biochem.**, 45, 1972. 510-516.
- ROBYT, J. F.; WHELAN, W. J. Reducing value methods for maltodextrins: I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. **Analytical Biochemistry**, 45, 1972. 510-516.
- RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. Estudo da produção de dextranase em função da concentração celular de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F., Rio de Janeiro, 2003.
- RUCKEL, E. E.; SCHUERCH, C. Chemical synthesis of a dextran model, poly-a-(1,6)-anhydro-D-glucopyranose. In: GOODMAN, M. **Biopolymers**. Chichester: Wiley, v. 5, 1967. p. 515-523.
- RUSSEL, R. R. B. Purification of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase by polyethylene glycol phase precipitation. **FEMS Microbiol. Lett.**, 6, 1979. 197-199.
- SABATIE, J. *et al.* The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B 512F. **Biotech. Lett.**, 8, 1986. 425-430.

- SADDFORD, P. A. Exocellular, microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 36, 1979. 265-313.
- SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(F). **Biochemical Engineering Journal**, 25, 2005. 1-6.
- SANTOS, M.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 5125(F). **Biochemical Engineering**, 4, 2000. 177-188.
- SCHEIBLER, C. Investigation on the nature of the gelatinous excretion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices. **Z Dtsch Zucker-Ind**, 24, 1874. 309-335.
- SEIBEL, J. *et al.* Identification of new acceptor specificities of glycosyltransferase R with the aid of substrate microarrays. **Chembiochem**, 7, 2006. 310-320.
- SEO, E. *et al.* Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextransucrase with high concentration of sucrose. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, 2007. 1117-1123.
- SETO, H. *et al.* Novel carbonyl-group-containing dextran synthesis by pyranose-2-oxidase and dextransucrase. **Carbohydr. Res.**, 343, 2008. 2417-2421.
- SEYMOUR, F. R. Correlation of the structure of dextran to their ¹H NMR spectra. **Carbohydrate Research**, 74, 1979. 77-92.
- SEYMOUR, F. R.; KNAPP, R. D. Structural analysis of dextran from strains of *Leuconostoc* related genera, that contain 3-O- α -glucosylated-D-glucopyranosyl residues at the branched points of in consecutive linear position. **Carbohydr. Res.**, 81, 1980. 105-129.
- SHAFFER, P. A.; SOMOGYI, M. Copper-iodometric reagents for sugar determination. **J. Biol. Chem.**, 100, 1933. 695-700.
- SHINGEL, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and agar-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, 337, 2002. 1445-1451.
- SIDEBOTHAM, R. L. Dextrans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, 30, 1974. 371-444.
- SMITH, M. R.; SAHNLEY, J.; GOODMAN, N. glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 1994. 2723-2731.
- STACEY, M. Enzymatic Production of Bacterial Polysaccharides. **Nature**, 149, 1942. 639-639.

- SUWANNARANGSEE, S. *et al.* for a dextranucrase minimal motif involved in dextran binding. **FEBS Lett.**, 581, 2007. 4675-4680.
- SUZUKI, D.; KOBAYASHI, T. Purification of dextranucrase and branching factor in dextran synthesis. **Agric. Biol. Chem.**, 39, 1975. 557-558.
- TAKAGI, K. *et al.* Purification and some properties of dextranucrase from *Streptococcus bovis* 148. **J. Ferment. Bioeng.**, 77, 1994. 551-553.
- TAKASHIO, M.; OKAMI, Y. Effect of ribocitrin on glucan synthesizing enzymes of *Streptococcus mutans* E49. **Agric. Biol. Chem.**, 47, 1983. 261-2171.
- TANRISEVEN, A.; ROBYT, J. F. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextranucrase, and the demonstration of a separate acceptor. **Carbohydr. Res.**, 225, 1992. 321-329.
- TANRISEVEN, A.; ROBYT, J. F. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextranucrase, and the demonstration of a separate acceptor binding-site. **Carbohydr. Res.**, 225, 1992. 321-329.
- THOMAS, J. A.; SCHLENOER, K. K.; LARNER, J. A Rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen Glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP14C-glucose. **J. Anal. Biochem.**, 25, 1968. 486-499.
- TING, S. V. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugars and fructose in citrus juices. **Agricultural and Food Chemistry**, 393, 1956.
- TSUCHIYA, H. M. *et al.* The effect of certain cultural factors on production of dextranucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Bacteriol.**, 64, 1952. 521-526.
- TSUCHIYA, H. M. *et al.* Modification of dextran synthesis by means of alternate glucosyl acceptors. **J. Am. Chem. Soc.**, 77, 1955. 2412-2419.
- UI-QADER, S. A. *et al.* Production of dextran from sucrose by a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* (PCSIR-3) with reference to *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 34, 2001. 93-97.
- UL-QADER, S. A. *et al.* characterization of dextranucrase immobilized on calcium alginate beads from *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4. **Ital. J. Biochem.**, 56, 2007. 158-162.
- US Patent. **United States Patent and Trademark Office**, 2010. (An Agency of the United States Department of Commerce) (Acesso em 19/01/2010).
- VALDIVIA, L. A. *et al.* Effect of borate ions on dextranucrase acceptor reaction. **Biotech. Lett.**, 9, 1987. 1-6.

- VAN TIEGHEM, P. On sugar-mill gum. **Annales des Science**, 7, 1878. 180-203.
- VELJKIVIC, V. B. *et al.* Effects of aeration on extracellular dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme Microb Technol**, 14, 1992. 668-668.
- VIET, D.; BECK-CANDANEDO, S.; GRAY, D. G. Synthesis and characterization of blue dextrans. **Carbohydrate Polymers**, 74, 2008. 372-378.
- WANG, W.; HOLLMANN, R.; DECKWER, W. D. Comparative proteomic analysis of high cell density cultivations with two recombinant *Bacillus megaterium* strains for the production of a heterologous dextranucrase. **Proteome Sci**, 4, 2006. 23-46.
- WILLEMONT, R. M.; MONSAN, P.; DURAND, G. Effects of Dextran on the Activity and Stability of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 542, 1988. 169-172.
- YALIN, Y. *et al.* Expression and characterization of dextranucrase gen dsrX from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, 133, 2008. 505-512.
- YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K.; OKADA, S. Detailed action mechanism of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. **Biotechnology and Biochemistry**, 57, 1993. 47-50.
- YOKOYAMA, I.; KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K. Purification of the dimeric form of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* strains NRRL B-146 and B-1375. **Agric. Biol. Chem.**, 49, 1985. 1385-1391.
- YOON, S. H.; BRUCE FULTON, D.; ROBYT, J. F. Enzymatic synthesis of two salicin analogues by reaction of salicyl alcohol with *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase and *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextranucrase. **Carbohydr. Res.**, 339, 2004. 1517-1529.
- ZAHLEY, J. C.; SMITH, M. R. Insoluble glucan formation by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. **Appl. Environ. Microbiol**, 61, 1995. 1120-1123.
- ZHANG, H. *et al.* Cloning, sequencing and expression of a dextranucrase gene (dexYG) from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnol. Lett.**, 30, 2008. 1441-1446.