

# Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa

Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes\* e Crispin Humberto Garcia Cruz

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Cristovão Colombo 2265, 15054-000, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: fernandaer@ig.com.br

**RESUMO.** A levana é um exopolissacarídeo sintetizado por vários microrganismos durante a fermentação de um meio de cultura à base de sacarose, extrato de levedura e sais minerais. Este biopolímero pode ser usado tanto na área de alimentos, como estabilizante, espessante e fixador de cor e sabor, quanto na farmacêutica, como hipocolesterolêmico e anticarcinogênico. O artigo teve como objetivo analisar a influência da temperatura e do pH, em relação a diferentes tempos de fermentação, no desenvolvimento celular e na produção de levana, por fermentação submersa. O microrganismo utilizado foi *Zymomonas mobilis* CCT 4494, incubado num meio de cultura quimicamente definido, acrescido de 200,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Amostras do caldo de fermentação foram recolhidas a cada 24h, durante o período de 96h, para posteriormente serem submetidas aos métodos analíticos: pH, biomassa, teores de açúcares redutores e de açúcares redutores totais e da formação de levana. Observou-se que os rendimentos obtidos de biomassa e do biopolímero sintetizado, em 24h, foram superiores àqueles obtidos em 48, 72 e 96h de fermentação.

**Palavras-chave:** levana, *Zymomonas mobilis*, fermentação submersa, exopolissacarídeo, bactéria, parâmetros cinéticos.

**ABSTRACT.** Analysis of kinetic parameters for levan production by *Zymomonas mobilis* using submerged fermentation. Levan is an exopolysaccharide synthesized by several microorganisms during fermentation of a culture medium containing sucrose, yeast extract and minerals. This biopolymer has applications in the food segment as stabilizers, thickeners, as carriers for flavor and fragrances, as well as in the pharmaceutical segment as a hypocholesterolemic agent and for exhibiting antitumor activity. This work aimed to analyze the kinetic parameters for levan production. The microorganism used was *Zymomonas mobilis* CCT 4494, incubated in a synthetic medium containing 200.0 g L<sup>-1</sup> of sucrose, in a rotary shaker at 200 rpm and 30°C. Samples were taken every 24h, during a period of 96h, in order to determine variations of pH, biomass, reducing sugar, total reducing sugar and levan formation. It was observed that yields of biomass and synthesized biopolymer in 24h were superior to those obtained in 48, 72 and 96h of fermentation.

**Key words:** levan, *Zymomonas mobilis*, submerged fermentation, exopolysaccharide, bacteria, kinetic parameters.

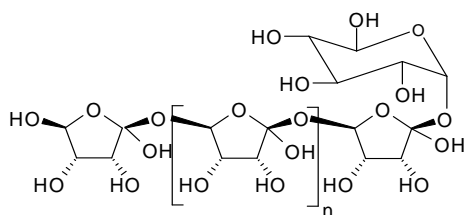
## Introdução

A bactéria *Zymomonas mobilis*, geralmente, é empregada para a produção de etanol a partir da sacarose, frutose ou glicose (NETO et al., 2006). Porém, na fermentação, em alta concentração inicial de sacarose, a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo dos seus monossacarídeos. Consequentemente, os monossacarídeos acumulam-se no caldo de fermentação e favorecem a formação de subprodutos, como a levana e sorbitol, o que reduz o rendimento em etanol (KANNAN et al., 1993).

O termo levana (Figura 1) refere-se a um exopolissacarídeo obtido pela reação de

transfrutosilação durante a fermentação de culturas crescidas em meios ricos em sacarose. Segundo Viikari (1988), a levana é produzida a partir da sacarose, e não da glicose, frutose ou misturas de ambas. Sendo um anidrofructosilfructosídeo solúvel em água, a levana pode também ser chamada de polifrutana pelo fato de ser constituída de moléculas de frutose.

A levana possui peso molecular de aproximadamente 10<sup>7</sup> Daltons, correspondente a, aproximadamente, 60.000 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6). Os polímeros de levana são lineares ou ramificados (graus variáveis) na hidroxila do carbono 1 (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).



**Figura 1.** Estrutura  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) da ramificação principal da levana.

A levana é facilmente produzida por diferentes tipos de bactérias durante a assimilação de sacarose, e alguns dos microrganismos estudados por vários pesquisadores se encontram na Tabela 1.

**Tabela 1.** Microrganismos produtores de levana.

Microrganismos produtores de levana	Pesquisadores
<i>Acetobacter suboxydans</i>	Thachenko e Sevryugina (1989)
<i>Aerobacter levanicum</i>	
<i>Erwinia herbicola</i>	Gunasekaran e Raj (1999)
<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>Bacillus polymyxa</i>	Han e Clarke (1990)

Fonte: Ernandes e Garcia-Cruz (2005).

Durante a produção de levana por microrganismos, Kannan et al. (1993) relatam que existem três enzimas distintas que podem estar envolvidas na hidrólise da sacarose: a sacarase intracelular (SacA), a levanasacarase extracelular (SacB) e a sacarase extracelular (SacC). A levanasacarase extracelular (EC 2.4.1.10) converte a sacarose em frutanas com pontes  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6), pois transfere o radical fructosil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não-redutor, formando a cadeia da levana. A levanasacarase pode ser produzida por diversas famílias de bactérias como *Pseudomonas* ssp., *Acetobacter aceti* e *Aerobacter levanicum*, *Bacillus natto* e *Bacillus polymyxa*. *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* são as mais estudadas pela grande capacidade de produção de levana (BEKERS et al., 2000).

Han e Clarke (1990) observaram que a atividade da levanasacarase está envolvida em processos variados, como sobrevivência de bactérias no solo (*Bacillus subtilis*), fitopatogeneses (*Erwinia* e *Pseudomonas* ssp.) ou simbiose de plantas interagindo com bactérias (*Bacillus polymyxa*).

Segundo Leibovici et al. (1979), é possível o uso de levana em medicina como um componente funcional dotado de atividade biológica para o funcionamento adequado do organismo humano. A literatura relata usos práticos de levana para vários propósitos, por exemplo, como complexo biologicamente ativo, substituto de plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, preparação de frutose altamente purificada para uso médico, fator de promoção do crescimento de *Bifidus*, agente hipocolesterolêmico e como imunomodulador e anticarcinogênico.

Na indústria de alimentos, a levana tem vários usos potenciais: agente espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos (TANO; BUZATO, 2003).

Os microrganismos produtores de levana também produzem fructooligosacarídeos (FOS), que possuem várias funções fisiológicas. Estes oligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas digestivas e, então, são usados em alimentação de pessoas com diabetes. Além disso, inibem o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos (VIIKARI; GISLER, 1986).

O alto custo de produção de polissacarídeos como a xantana e dextrana incita novas pesquisas para estudar outros polissacarídeos microbianos, como a levana; além de suas aplicações em diversas áreas, como saúde e alimentação humana, é de interesse econômico fundamental o seu aproveitamento, uma vez que se trata de um subproduto da fermentação durante a produção de etanol.

Na literatura, nem sempre têm sido consideradas as condições de cultivo e dos processos fermentativos para produção de levana e, quando disponíveis, os dados publicados demonstram que a temperatura e o pH a serem utilizados dependerão do que se deseja maximizar no final do processo.

Há divergências entre diversos autores, com respeito à temperatura e o pH ideal para a produção de levana pela *Zymomonas mobilis*. A influência do pH, da temperatura e a composição do meio de fermentação são manipulados com o objetivo de aumentar a produção de etanol e reduzir a formação dos outros subprodutos (levana e sorbitol), porém são raros os trabalhos existentes que visam melhorar o desempenho da bactéria para a produção destes subprodutos.

O interesse comercial pela levana motiva pesquisas tanto para a identificação de novos microrganismos produtores quanto para processos que visem à otimização de sua produção em escala industrial. O artigo teve como objetivo analisar a influência da temperatura e do pH, em relação a diferentes tempos de fermentação, no desenvolvimento celular e na produção de levana, por fermentação submersa. O microrganismo utilizado foi *Zymomonas mobilis* CCT 4494, incubado num meio de cultura quimicamente definido, acrescido de 200 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Amostras do caldo de fermentação foram recolhidas a cada 24h, durante o período de 96h, para posteriormente serem submetidas aos métodos analíticos: pH, biomassa, teores de açúcares redutores e de açúcares redutores totais e da formação de levana.

## Material e métodos

Microorganismo: *Zymomonas mobilis* CCT 4494, obtido da Coleção de Culturas Tropical (Campinas).

Meio de manutenção: o meio foi composto de caldo de cana clarificado (100 mL); água destilada (30,0 mL);  $\text{CaCO}_3$  (0,4 g); extrato de levedura (0,4 g) e ãgar nutriente (1,5 g). Após incubação por 24h a 30°C, a cultura bacteriana foi mantida a 4°C e reativada a cada 30 dias.

Meio de produção: foi utilizado o meio quimicamente definido (RODRIGUEZ; CALLIERI, 1986) com a adição de 20% de sacarose como fonte de carbono. O meio foi composto em g L<sup>-1</sup> de: extrato de levedura (5,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,0) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0).

Produção do biopolímero:

- Pré-fermentação: a cepa foi repicada, por estrias em esgotamento, em tubos inclinados contendo o meio de manutenção. Após as 24h de incubação, foi feita a suspensão da cultura de células bacterianas pela adição de 5,0 mL de água destilada estéril e a transferência para frascos de Erlenmeyer de 250,0 mL contendo 50,0 mL do meio de produção com pH inicial 7,0. Os frascos foram incubados em Shaker rotatório a 30°C e 200 rpm (rotações por minuto), durante 24h, e o meio utilizado foi composto pelo meio sintético adicionado de sacarose na concentração de 20,0 g L<sup>-1</sup> (2,0%);

- Fermentação: os frascos de Erlenmeyer de 250,0 mL contendo 50,0 mL do meio de produção foram inoculados com o caldo obtido da pré-fermentação e incubados em Shaker rotatório a 30°C e 200 rpm. Para a padronização do volume de inóculo adicionado em cada frasco, amostras foram recolhidas a cada 24h, durante o período de 96h de fermentação, para serem submetidas aos métodos analíticos.

Métodos analíticos: *análise do pH* diretamente no caldo fermentado por potenciometria; estimativa da concentração de levana (o polissacarídeo foi separado do sobrenadante de cada amostra obtida a cada 24h de fermentação, após centrifugação a 8.000 rpm e 4°C, durante 15 min., para retirada das células. Foi feita a precipitação pela adição de três volumes de etanol anidro, previamente resfriado. O precipitado de levana foi seco em estufa a vácuo, a 45°C, até peso constante, em aproximadamente 24h, e o rendimento de levana foi calculado pela relação entre gramas do polissacarídeo obtido e gramas consumidos da fonte de carbono); estimativa da biomassa foi determinada pelo peso seco das células obtidas após a centrifugação do caldo de fermentação; teor de cinzas do polissacarídeo bruto foi obtido pelo método descrito nas Normas

Técnicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). Os teores de açúcares redutores totais (ART) e açúcar redutor (AR) foram determinados no sobrenadante do caldo de fermentação pelo método do ácido dinitrossalicílico – DNS, descrito por Miller (1959). Na determinação de ART, foi hidrolisada uma alíquota do sobrenadante (contendo sacarose não-consumida pelo microorganismo) com HCl 1,0 N, aquecida em banho de água em ebulição, por 15 min., resfriada e neutralizada com NaOH 1,0 N. Foi utilizada glicose como padrão para construção de uma curva-padrão para obtenção da equação para o cálculo de AR e ART. O cálculo da sacarose residual foi obtido pela diferença de ART e AR.

## Resultados e discussão

Os parâmetros cinéticos da fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 utilizando o meio sintético a pH 7,0, acrescido de 5,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 200,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, estão apresentados na Tabela 2. O acompanhamento das fermentações durante 96h, a 30°C, consistiu na retirada de amostras, a intervalos de tempos pré-determinados (24h), para determinação do pH, massa celular, rendimento de levana, açúcares redutores, açúcares redutores totais e teor de cinzas presentes no biopolímero bruto obtido.

Conforme Kawai (1992), muitos polissacarídeos bacterianos são produzidos seguindo um processo de fermentação descontínua, utilizando diferentes açúcares como fontes de carbono, e a produtividade destes pode ser afetada por condições culturais, composição do meio de cultura, temperatura, pH e aeração. Com base nessa afirmação, observa-se, pela Tabela 2, que os parâmetros de fermentação testados influenciaram diretamente o desenvolvimento celular e a produção de levana.

**Tabela 2.** Parâmetros cinéticos da fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, no meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986), adicionado de 200,0 g L<sup>-1</sup> de sacarose e incubado a 30°C e 200 rpm.

Parâmetros Cinéticos	<i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 Tempo de Fermentação (h)				
	PF	24	48	72	96
pH final	7,5	3,9	4,3	4,4	4,4
MC (g L <sup>-1</sup> )	1,9	5,6	5,0	4,8	3,6
Levana (g L <sup>-1</sup> )	-	63,2	70,2	80,8	84,7
Levana (%)	-	31,6	35,1	40,4	42,3
ART (g L <sup>-1</sup> )	nd	11,4	9,9	9,2	2,6
AR (g L <sup>-1</sup> )	nd	0,3	0,5	1,0	0,5
SACc (g L <sup>-1</sup> )	nd	188,9	190,6	191,8	197,9
SACr (g L <sup>-1</sup> )	nd	11,1	9,4	8,2	2,1
Cinzas (%)	nd	0,4	0,4	0,4	0,4

PF = pré-fermentação; MC = massa celular; ART = açúcares redutores totais; AR = açúcares redutores; SACc = sacarose consumida; SACr = sacarose residual; (-) = sem produção de levana; nd = não-determinado.

Os resultados obtidos confirmam que, durante a fermentação, a fonte de carbono foi convertida pela célula microbiana em biopolímero, em certos parâmetros fixos (pH, temperatura, tempo de incubação etc.). Resultados semelhantes, a respeito da utilização dos açúcares como substratos para a produção de levana, foram também observados por Dadds e Martin (1973), os quais relatam que *Zymomonas* precisa de um açúcar fermentescível no meio de cultura para o crescimento, que pode ser glicose, frutose ou ainda, para algumas linhagens, sacarose; Dawes et al. (1966), porém, afirmam que esse microrganismo produz levana somente a partir da sacarose, e não da glicose, frutose ou mistura de ambas.

Dadds e Martin (1973) consideram que o desenvolvimento total do microrganismo depende da natureza dos fatores limitantes, e que o pH é um dos fatores mais comuns juntamente com a exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos. Dentro de certos limites (6,5 a 8,0), o pH tem pouca influência na taxa de desenvolvimento, mas pode influenciar o número total de bactérias. No entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte. Além disso, para cada bactéria há também uma temperatura ótima de desenvolvimento, que pode variar da temperatura ótima de produção de polissacarídeo mesmo quando a bactéria se encontra em um meio adequado de nutrientes. De acordo como a Tabela 2, à medida que aumentou o tempo de fermentação, o valor de biomassa reduziu, mas isso não refletiu significativamente na produção de polissacarídeo e, conseqüentemente, no seu rendimento; pode-se observar que a maior produção do polissacarídeo ocorreu nas primeiras 24h, sendo o rendimento de 31,6%. Após os processos fermentativos, o pH final determinado no caldo de fermentação variou na faixa de 3,9 a 4,4. Outros experimentos também obtiveram valores semelhantes, como os de Doelle et al. (1989), os quais relatam que o pH final, depois de três dias, à temperatura de 30°C, em meio-padrão, foi entre 4,8 a 5,2 e que esta redução representa a formação de ácidos e a tolerância do microrganismo a pH baixo.

Além da fonte de carbono, é importante ressaltar que o pH do meio de cultura e a temperatura de fermentação também são fatores críticos que influenciam diretamente a produção do biopolímero e crescimento celular, devendo estes ser controlados durante toda a fermentação. A partir dos dados demonstrados na Tabela 2, o rendimento máximo

de levana obtido foi de 42,3% durante a fermentação a 30°C, com pH inicial 7,0, após as 72h de fermentação utilizando a linhagem *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Estudos realizados por Lyness e Doelle (1983) e Doelle et al. (1989) também concluíram que temperaturas de fermentação elevadas (42°C) e altos valores iniciais de pH (acima de 8,0) podem inibir a produção da enzima levanasacarase, responsável pela formação de levana por *Zymomonas mobilis*. Em outro estudo, Yokoya e Jerez (1996) demonstrou, pelos resultados da fermentação com *Zymomonas mobilis*, que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio. Utilizando a temperatura de 37°C, com e sem controle de pH, a taxa específica de crescimento foi maior e a quantidade de levana produzida foi menor que na temperatura de 30°C.

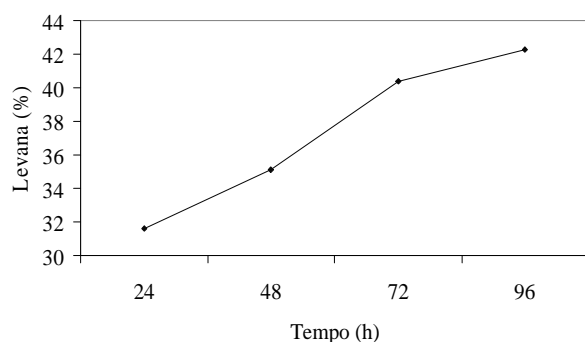
A partir da Tabela 2, observa-se que as amostras do polissacarídeo bruto obtidas, a partir do meio sintético, apresentaram baixos teores de cinzas, mantendo-os constantes, de acordo com os tempos de fermentação testados. Isso demonstra que a cepa adaptou-se ao meio de fermentação e seus constituintes sustentaram tanto o crescimento quanto a síntese de levana. Este comportamento está diretamente relacionado com a composição do meio, pois o crescimento e a formação de levana são afetados não só pela fonte de carbono como também pela presença de certos compostos químicos no meio de fermentação.

Belaich e Senez (1965) demonstraram que vários constituintes orgânicos da peptona ou do extrato de levedura não são utilizados como fontes de energia para o desenvolvimento, mas como blocos construtivos para biossíntese de levana. Em outro estudo, Vigants et al. (1998) verificaram que o efeito de sais minerais como KCl e NaCl não só estimulou a produção de etanol como também de levana, pois teve ação direta sobre a enzima levanasacarase, responsável pela produção de ambos os produtos. Além disso, várias enzimas da via Entner Doudoroff requerem cofatores como magnésio, cálcio, potássio para a produção de levana. Hoppner e Doelle (1983) reportaram que o cálcio e o magnésio ativam a enzima piruvato descaboxilase em *Zymomonas*, enquanto Bekers et al. (2000) observaram que o potássio ativa a enzima piruvato quinase.

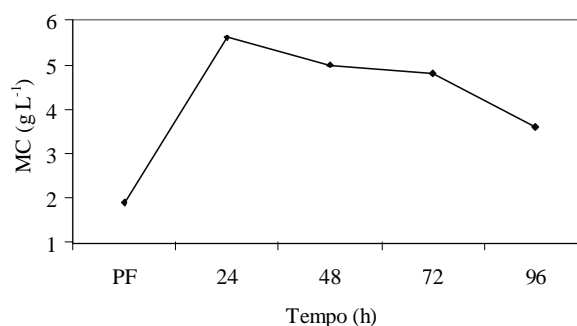
A aeração também é considerada fator de inibição para produção de levana. Foi observado no trabalho realizado por Han e Clarke (1990) que a produção do polissacarídeo aumentou quando a cultura foi levemente agitada durante a fermentação.

Segundo Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999), *Zymomonas mobilis* parece dispor de mecanismos bioquímicos reguladores da produção de levana, como substância de reserva temporária, quando não há alta disponibilidade de frutose no meio de fermentação. Para isso, ele pode utilizar-se da atividade da enzima levanasacarase. Durante a produção de levana por microrganismos, Kannan et al. (1993) relatam que existem três enzimas distintas que podem estar envolvidas na hidrólise da sacarose: a sacarase intracelular (SacA), a levanasacarase extracelular (SacB) e a sacarase extracelular (SacC). A função da SacA não é bem conhecida; a SacB é responsável pela formação da levana; a SacC, pela hidrólise da sacarose. Pela Tabela 2, observam-se os resultados obtidos pelas análises realizadas para determinação de ART e AR; nota-se também que o consumo de sacarose (SACc) foi alto desde o início da fermentação (24h) e que, consequentemente, a sacarose residual (SACr), expressa em  $\text{g L}^{-1}$ , reduziu ao longo do processo. Isto, possivelmente, favoreceu as atividades da sacarase extracelular e da invertase extracelular, duas das três enzimas citadas como responsáveis pela hidrólise da sacarose.

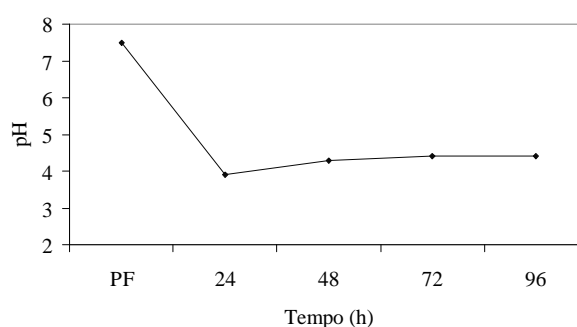
Na Figura 2, observa-se que o biopolímero foi sintetizado em maior quantidade após 24h de fermentação (31,6% de rendimento). Depois desse período, houve acréscimo no rendimento de levana de 3,5; 8,8 e 10,7%, com 48; 72 e 96h de fermentação. A maior massa celular produzida também ocorreu nas primeiras 24h de fermentação ( $5,6 \text{ g L}^{-1}$ ), o que fez com que o valor do pH 7,5 da amostra analisada na pré-fermentação caísse para 3,9 (Figura 3). Após esse período de fermentação, a bactéria desenvolveu-se bem no valor de pH 4,4, porém houve decréscimo na massa celular, chegando a  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  após as 96h (Figura 4).



**Figura 2.** Produção de levana (%) em relação ao tempo de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no meio sintético, adicionado de  $200,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e incubado a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm.



**Figura 3.** Formação de massa celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no meio sintético, adicionado de  $200,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e incubado a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm.



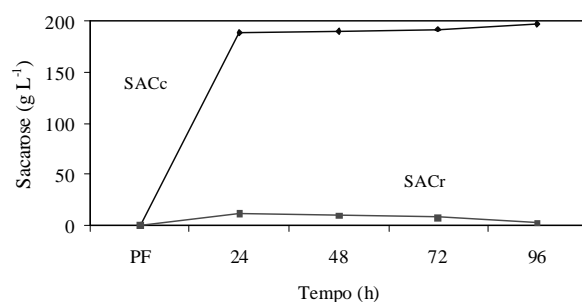
**Figura 4.** Determinação do pH em relação ao tempo de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no meio sintético, adicionado de  $200,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e incubado a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm.

Vários pesquisadores também estudaram os parâmetros cinéticos com *Zymomonas mobilis* e obtiveram resultados semelhantes. Yokoya e Jerez (1996) realizou experimentos para estudar a influência do pH sobre a formação de levana por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meios à base de sacarose e constatou que a linhagem se desenvolveu bem numa faixa de pH entre 4,5 e 6,0. O controle do pH ao longo da fermentação mostrou menor quantidade de levana precipitável em comparação com fermentações realizadas sem o controle do pH (pH entre 4,5 e 5,0). O rendimento em levana formada foi maior nas primeiras 24h de fermentação. A faixa de pH inicial, entre 5,5 e 6,0, nas fermentações com controle de pH, e naquelas contendo solução tampão, ocasionou maior eficiência bioquímica de produção de etanol e pequena formação de levana precipitável, em comparação às fermentações sem controle de pH. Além disso, o mesmo autor relatou que, após 48h de fermentação, constatou-se em alguns experimentos uma pequena diminuição da levana, pela hidrólise da mesma ao longo do processo fermentativo.

Baseando-se nos resultados obtidos nesta pesquisa observou-se que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 se desenvolveu numa faixa de pH 4,5 e 6,0; o rendimento de levana formada foi superior com 24h de

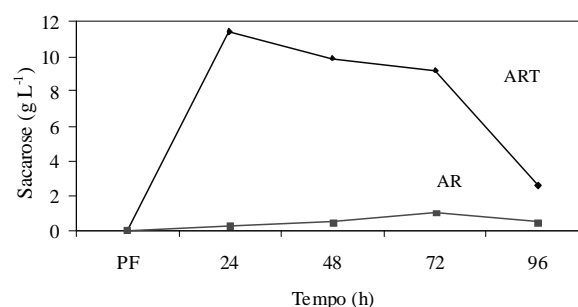
fermentação (11,1%), em relação às 72h (3,8%), pois as condições do meio favoreceram a via de produção do etanol. É importante ressaltar que os altos rendimentos de levana obtidos na faixa de pH 4,5 a 6,0 estão relacionados com o pH ótimo para a atividade da enzima levanasacarase. Segundo Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999), o pH ótimo para a atividade da enzima é de 6,5. Em culturas que contém sacarose, pode-se utilizar pH com valores menores para a produção adequada de levana pela mesma enzima. A temperatura ótima está na faixa de 25 a 30°C.

Na Figura 5, verificou-se que o consumo de substrato foi proporcional ao aumento de tempo de fermentação; o maior consumo de sacarose, porém, deu-se nas primeiras 24h para que *Zymomonas mobilis* pudesse usá-la para seu crescimento e para favorecer, possivelmente, a atividade da enzima levanasacarase extracelular (SacB), que converte a sacarose em frutanas com pontes  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) formando a cadeia de levana. Viikari (1988) observou a formação de levana imediatamente após a inoculação do meio de cultura com *Zymomonas mobilis*, mediante a quantificação por precipitação, e também observou que a síntese de levana atingiu seu máximo ao final da hidrólise da sacarose do meio, porém a precipitação de levana diminuiu após esse tempo. Depois de 10h de fermentação, a quantidade de levana decresceu, indicando que outros produtos somaram-se ao etanol e à levana precipitada. O autor presumiu que parte da levana poderia estar na forma não-precipitada. Para verificar isso, em sua pesquisa, amostras foram hidrolisadas com ácido fraco e os açúcares analisados formados. Foi observado que toda a sacarose foi hidrolisada, causando um incremento na quantidade de glicose e frutose, de forma que a concentração da última aumentou significativamente por causa da hidrólise, o que permitiu corrigir o cálculo da massa pela quantidade de frutose original a partir da sacarose hidrolisada. Assim, admitindo a hidrólise completa, a massa de levana produzida foi equivalente a 10% da sacarose inicial.



**Figura 5.** Determinação de SACc (sacarose consumida) e SACr (sacarose residual) ( $\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no meio sintético, adicionado de  $200,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e incubado a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm.

A partir da Figura 6, observou-se que a hidrólise da sacarose ao longo do processo indicaria a atividade da enzima sacarase extracelular (SacC). Os baixos valores de açúcares redutores obtidos pelas análises realizadas com as amostras em intervalos periódicos (24h) confirmam, segundo Viikari e Gisler (1986), baixa concentração de frutose, a qual parece estar associada com a formação de levana.



**Figura 6.** Determinação de AR e ART ( $\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 no meio sintético, adicionado de  $200,0 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e incubado a  $30^\circ\text{C}$  e 200 rpm.

## Conclusão

A partir dos experimentos realizados por fermentação submersa, utilizando um meio de cultura quimicamente definido, contendo alta concentração de sacarose inicial, observou-se que a temperatura e o pH, em relação aos diferentes tempos de fermentação testados, influenciou os valores de levana, biomassa e substrato residual consumido pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

De acordo com os resultados, observou-se que a produção de levana e a de biomassa foram superiores nas primeiras 24h de fermentação em relação aos demais tempos definidos (48, 72 e 96h). O consumo de substrato foi proporcional ao aumento de tempo de fermentação; o maior consumo de sacarose, porém, ocorreu no mesmo tempo de fermentação em que houve maior produção do biopolímero e de biomassa.

Os dados indicam que *Zymomonas mobilis* parece dispor de mecanismos bioquímicos reguladores para o seu crescimento e para a produção de levana. Para isso, ela pode utilizar-se da atividade da enzima levanasacarase extracelular (SacB), que converte a sacarose em frutanas com pontes  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) formando a cadeia de levana, como confirmam outros pesquisadores.

Pelo grande potencial de aplicações da levana nos setores alimentício e farmacêutico, os dados obtidos neste trabalho poderão acrescentar novos conhecimentos visando entender melhor as vias

metabólicas de síntese, a função fisiológica, a biologia do microrganismo produtor; com isso, pode-se induzir a formação de um polímero com características e composição constantes, e ainda melhorar o processo de produção.

## Referências

- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999.
- BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPORORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 147-150, 2000.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1195-1200, 1965.
- DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas*: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 5, p. 386-391, 1973.
- DAWES, E.; RIBBONS, D. W.; REES, D. A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. **Biochemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 804-812, 1966.
- DOELLE, M.; MILLICHIP, R.; DOELLE, H. W. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 137-140, 1989.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 71-82, 2005.
- GUNASEKARAN, P.; RAJ, K. C. Ethanol fermentation technology: *Zymomonas mobilis*. **Currency Science**, v. 77, n. 1, p. 56-68, 1999.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 393-396, 1990.
- HOPPNER, T. C.; DOELLE, H. W. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 152-157, 1983.
- IAL-Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. In: IAL-Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. p. 27.
- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 265-270, 1993.
- KAWAI, H. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 853-857, 1992.
- LEIBOVICI, J.; BORITA, A.; SANDBANK, U.; WOLMAN, M. Role of macrophages and polymorphs in the levan-induced inhibition of Lewis lung carcinoma in C57BL mice. **British Journal of Cancer**, v. 40, n. 1, p. 597-606, 1979.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 5, p. 345-350, 1983.
- MILLER, G. L. Use of DNS acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. L. asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 28, n. 2, p. 151-153, 2006.
- RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 10, p. 745-748, 1986.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 34, p. 242-244, 2003.
- THACHENKO, A. A.; SEVRYUGINA, T. V. Biosynthesis of levan by *Bacillus polymyxa*. **Translated from Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 457-461, 1989.
- VIGANTS, A.; KRUCE, R.; BEKERS, M.; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 1998.
- VIKARI, L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*: Critical Review. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 3, p. 231-261, 1988.
- VIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 240-244, 1986.
- YOKOYA, F.; JEREZ, M. C. D. Efeito da temperatura e pH na produção de etanol e levana durante a fermentação de sacarose por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 1, p. 129-137, 1996.

Received on November 1, 2007.

Accepted on August 8, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.