

Daniele Cristina dos Santos Bofo

Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura contendo sacarose e caracterização do sistema enzimático responsável pela hidrólise de sacarose e de formação de levana

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração - Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

São José do Rio Preto
2009

Bofo, Daniele Cristina dos Santos.

Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura contendo sacarose e caracterização do extrato enzimático responsável pela atividade de hidrólise de sacarose e de formação de levana / Daniele Cristina dos Santos Bofo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

105 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Polissacarídeos Microbianos. 2. Levana. 3. *Zymomonas mobilis*. 4. Caracterização da levanasacarase. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.124.5

DANIELE CRISTINA DOS SANTOS BOFO

Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura contendo sacarose e caracterização do sistema enzimático responsável pela hidrólise de sacarose e de formação de levana

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração - Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto, 30 de janeiro de 2009

Dedico este trabalho a meu marido, que com sua paciência e amor soube me apoiar e aconselhar nas horas mais difíceis, e a meus pais, pelo apoio e dedicação. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata, e sem a ajuda de vocês certamente não teria chegado até aqui. Amo muito todos vocês.

Daniele Cristina dos Santos Bofo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao SENHOR DEUS, por ter me dado forças, perseverança e paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer ao meu querido Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz por seus ensinamentos, sua dedicação e amizade, que serão guardados sempre com muito carinho.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho e financiamento do projeto.

À minha amiga Fernanda M. P. G. Ernandes, que durante a execução deste trabalho esteve sempre presente me auxiliando e aconselhando, visando sempre à melhoria do mesmo.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Luiz, Newton e Tânia, e aos meus amigos do Laboratório de Biopolímeros Adriana Navarro, Luiz Gustavo e Marcos Celli, agradeço pelo apoio recebido.

Aos professores da banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para a correção do meu trabalho.

Às minhas amigas Carolina M. Cavallini, Thaise Mariá Tobal, Fernanda Carnielo e Renata Mussolini, que estiveram presentes e sempre me ajudaram a enxergar com mais naturalidade e humor os problemas que enfrentava.

Sou grata também a todos os colegas, estagiários e funcionários do Departamento que de alguma forma tornaram mais harmonioso e saudável o nosso ambiente de trabalho.

Agradeço aos meus pais João Carlos e Sandra Helena e à minha irmãzinha Danubia pelo incentivo, amor e paciência demonstrados sempre durante toda a minha vida.

Aos meus tios Antônio e Venilda pelo apoio recebido durante todo o tempo em que morei em São José do Rio Preto.

E agradeço muito ao meu marido Denimarcos, uma pessoa muito importante em minha vida, que com sua sabedoria, amor e paciência soube me ajudar a superar todos os obstáculos enfrentados neste período. Te amo muito.

RESUMO

A levana é um polissacarídeo formado basicamente de unidades de frutose ligadas em $\beta(2\rightarrow6)$. Este biopolímero possui diversas aplicações tanto na indústria alimentícia quanto na área da saúde. A levana é produzida pela bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis*. Por fermentação de um meio contendo sacarose, esse microrganismo lança ao meio de cultura duas enzimas extracelulares: a sacarase extracelular e a levanasacarase. A enzima sacarase extracelular (SacC) tem uma alta atividade específica de hidrólise de sacarose e a enzima levanasacarase (SacB) é responsável tanto pela hidrólise do dissacarídeo quanto pela formação de levana. Dentre os fatores que regulam as atividades enzimáticas podemos citar o tampão utilizado (pH), a temperatura, a concentração de sacarose e a presença de íons metálicos. O presente projeto teve por objetivos determinar os melhores parâmetros para a produção do biopolímero levana e seu extrato enzimático, após fermentação do meio de cultura por *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Além disso, foi caracterizado o extrato enzimático quanto à atividade de hidrólise de sacarose e de formação de levana. Os resultados obtidos mostraram que a maior produção de levana ocorreu em 96 horas de fermentação, num meio contendo 200g/L de sacarose, incubado a 30°C, 200rpm e pH inicial de 6,0. Entretanto, o extrato enzimático bruto com maior atividade de sacarase foi obtido num meio com 200g/L de sacarose, 200rpm, 30°C, pH inicial de 7,0 e 6 horas de incubação. Para a caracterização deste extrato enzimático bruto, quanto a sua atividade de hidrólise de sacarose, inicialmente determinou-se o período ideal de reação com o substrato, sendo o mesmo definido como 10 minutos. Posteriormente foram determinados o pH, a temperatura e a concentração de sacarose ótimos, sendo de 4,0, 40°C e 0,15M, respectivamente. O sistema enzimático teve a maior estabilidade em pH 4,0, mantendo 100% de sua atividade de sacarase, e em valores de pH 5,5 e 6,5 manteve praticamente 80 e 65% de sua atividade, respectivamente, sendo inativado em valores de pH acima de 7,0. Também permaneceu estável em temperaturas de 25 a 40°C, mantendo 100% de sua atividade de sacarase. A maior produção da enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto, livre de células, responsável pela formação de levana, ocorreu após 12 horas de incubação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 num meio contendo sacarose 200g/L adicionado de sais, pH inicial de 7,0, agitação de 200rpm e temperatura 30°C. Antes da caracterização da enzima responsável pela formação de levana, foi verificada a ausência das células bacterianas no meio reacional e produção do

biopolímero somente pela levanasacarase. A ausência de células foi determinada por coloração de Gram. Para tanto foram realizados diferentes ensaios utilizando sacarose estéril e não estéril 200g/L em tampão acetato de sódio 50mM com e sem adição de cloranfenicol (10µg/mL) e temperatura de reação de 4,0°C. A maior produção do biopolímero ocorreu no meio reacional composto por 200g/L de sacarose não estéril em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0, temperatura de reação 30°C e adição de cloranfenicol. Para caracterização da enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto e conseqüente determinação da maior atividade de formação de levana foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, seguindo um planejamento fatorial do tipo 3^{4-0} . As variáveis independentes estudadas foram: pH do meio reacional, tempo e temperatura de reação e concentração de sacarose presente no meio, totalizando 81 experimentos, realizados em triplicata. Os resultados obtidos nestes experimentos mostraram que as variáveis independentes, concentração de sacarose e tempo de reação, e as interações entre a concentração de sacarose e a temperatura de reação e entre a concentração de sacarose e o tempo de reação foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para a atividade enzimática de formação de levana. Também pode ser observado que os níveis foram bem escolhidos devido ao baixo valor de p encontrado para o intercepto Y_1 . Posteriormente, verificou-se que a atividade enzimática de formação de levana, do extrato enzimático bruto, ficou estável quando submetido ao congelamento durante 3 meses, não havendo perda da mesma. A adição de íons metálicos, CaCl_2 e KCl , teve efeito positivo na atividade enzimática, ao aumentar a mesma em 20 e 10%, respectivamente. Entretanto a adição de MgSO_4 não afetou a atividade enzimática da levanasacarase do extrato enzimático.

Palavras-Chave: *Zymomonas mobilis* CCT 4494, *Levanasacarase* e *Sacarase Extracelulares*.

ABSTRACT

The levan is a polysaccharide formed basically of units of fructose connected in $\beta(2\rightarrow6)$. This biopolymer has many applications in both the food industry as in health. The levan is produced by Gram-negative bacteria *Zymomonas mobilis*. By fermentation of a medium containing sucrose, this microorganism launches to the middle of culture two enzymes extracellular: the extracellular sucrase and levansucrase. The enzyme extracellular sucrase (SacC) has a high specific activity of hydrolysis of sucrose and the enzyme levansucrase (SacB) is responsible for hydrolysis of both disaccharides as the formation of levan. Among the factors that regulate the enzymatic activities can cite the buffer used (pH), the temperature, concentration of sucrose and the presence of metal ions. This project aimed at determining the best parameters for the production of the biopolymer levan and its enzymatic extract, after fermentation of the mean of culture by *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Moreover, was characterized the enzymatic extract as the activity of hydrolysis of sucrose and training of levan. The results showed that the majority production of levan occurred on 96hours of fermentation, in a medium containing 200g/L of sucrose, incubated at 30°C, 200rpm and initial pH of 6.0. Meanwhile, the crude enzymatic extract with higher activity of sucrase was achieved in a medium with 200g/L of sucrose, 200rpm, 30°C, initial pH of 7.0 and 6 hours of incubation. For the characterization of this crude enzymatic extract, as its activity in hydrolysis of sucrose, initially it was determined the ideal period of reaction with the substrate, being the period defined as 10 minutes. Later were determined the pH, the temperature and the concentration of sucrose great, being 4.0, 40°C and 0,15M respectively. The enzymatic system was more stable at pH 4.0, keeping 100% of your activity of sucrase, and pH values of 5,5 and 6,5 remained largely 80 and 65% of its activity, respectively, being inactivated in values the pH above 7.0. It also remained stable at temperatures of 25 to 40°C, maintaining 100% of your activity of sucrase. The increased production of the enzyme levansucrase present in crude enzymatic extract, free of cells, responsible for the formation of levan, occurred after 12hours of incubation of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 in a medium containing sucrose 200g/L added of salt, initial of pH 7,0, agitation of 200rpm and temperature 30°C. Before the characterization of the enzyme responsible for the formation of levan, was verified a lack of bacterial cells in the middle reaction and production of the biopolymer only by levansucrase. The absence of cells was determined by Gram stain. For

both were performed different tests using sucrose sterile and non sterile 200g/L in 50mM sodium acetate buffer with and without the addition of chloramphenicol (10µg/mL) and the reaction of temperature of 4.0 °C. The increased production of biopolymer occurred in the middle reaction composed of 200g/L of sucrose not sterile in sodium acetate buffer 50mM and pH 4.0, reaction temperature of 30°C and addition of chloramphenicol. For characterization of the enzyme levansucrase present in crude enzymatic extract and consequent determination of the majority activity of training of levan was used the response surface methodology, using a factorial design of the type 3^{4-0} . The independent variables analyzed were: pH of the medium reaction, time and reaction temperature and concentration of sucrose in the middle, totaling 81 experiments, conducted in triplicate. The results obtained in these experiments showed that the independent variables, sucrose concentration and reaction time, and the interactions between the concentration of sucrose and the temperature of reaction and of the concentration of sucrose and the reaction time were statistically significant ($p < 0,05$) for the enzyme activity of training of levan. It can also be observed that the levels were well chosen because of the low value of p found to the intercept Y_1 . Later it was found that the enzyme activity of training of levan, of the crude enzymatic extract, was stable when subjected to freezing during 3 months, with no loss of it. The addition of metal ions, CaCl_2 and KCl , had positive effect on the enzyme activity, to increase it on 20 and 10% respectively. However the addition of MgSO_4 did not affect the enzymatic activity of the levansucrase of the enzymatic extract.

Keywords: *Zymomonas mobilis* CCT 4494, Levansucrase and extracellular sucrose.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido	53
Equação 2	Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido	53
Equação 3	Produtividade	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Química da Levana	23
Figura 2	Metabolismo dos carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i>	29
Figura 3	Esquema do tratamento analítico das amostras obtidas após processo fermentativo, a partir de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, utilizando meio sintético acrescido de 20,0g/L de sacarose inicial após fermentação a 30°C e 200rpm, por 24 horas	101
Gráfico 2	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (g/L) pelo método Somogyi-Nelson	102
Gráfico 3	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois et al. (1956)	103
Gráfico 4	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (umol/ml) pelo método Somogyi-Nelson	104
Gráfico 5	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (umol/ml) pelo método Glicose-Oxidase-Peroxidase	105
Gráfico 6	Quantificação dos açúcares totais (mg/mL) nos meios com diferentes valores de pH inicial, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm, incubação a 30°C, durante 96 horas de fermentação. (pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	61
Gráfico 7	Quantificação dos açúcares redutores (mg/mL) nos meios com diferentes valores de pH inicial, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm, incubação a 30°C, durante 96 horas de fermentação. (pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	61
Gráfico 8	Efeito da variação do pH inicial no meio contendo 200g/L de sacarose na produção de levana por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 em diferentes tempos de fermentação incubados a 30°C e 200rpm (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	62
Gráfico 9	Determinação do Rendimento Celular ($Y_{X/S}$) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	64

Gráfico 10	Determinação do Rendimento do Produto ($Y_{P/S}$) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	64
Gráfico 11	Determinação da Produtividade (P) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	64
Gráfico 12	Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 5,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).	66
Gráfico 13	Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 6,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).	66
Gráfico 14	Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 7,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).	66
Gráfico 15	Determinação da atividade de sacarase num meio ajustado a diferentes valores de pH, diferentes tempos de fermentação, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	67
Gráfico 16	Curvas de progresso de reação para duas concentrações iniciais diferentes de extrato enzimático. (0,1ml de extrato enzimático + 0,9ml de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM e pH 5,0 (■); 0,2ml de extrato enzimático + 0,8ml de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM e pH 5,0 (●)).	69
Gráfico 17	Determinação de açúcares redutores formados em função do tempo (0,1ml de extrato enzimático + 0,9ml de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM pH 5,0 (■)).	69

Gráfico 18	Determinação do pH ótimo para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto, em meio reacional composto por 10% de sacarose em diferentes tampões e valores de pH na concentração 0,05M, e reação a 30°C por 10 minutos.	71
Gráfico 19	Determinação da temperatura ótima para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto, em meio reacional composto por 10% de sacarose em tampão acetato de sódio 0,05M e pH 5,0, e reação a diferentes temperaturas (20 a 50°C) por 10 minutos.	72
Gráfico 20	Determinação da Energia de Ativação necessária para ocorrer a reação de hidrólise de sacarose pelo extrato enzimático bruto.	72
Gráfico 21	Efeito da concentração de sacarose sobre a velocidade enzimática de sacarase do extrato enzimático bruto. Os ensaios foram realizados com 0,1ml de extrato bruto e 0,9mL de tampão 50mM e pH 4,0 com diferentes concentrações de sacarose e temperatura de reação 40°C.	73
Gráfico 22	Linearização dos dados obtidos de Velocidade Enzimática e Concentração de Sacarose para obtenção dos parâmetros cinéticos V_{Max} e K_M .	74
Gráfico 23	Determinação da estabilidade ao pH do extrato enzimático bruto para atividade de sacarase. O extrato enzimático foi mantido em tampão 50mM com diferentes valores de pH (4,0 a 7,0) por 24h em temperatura ambiente, e após foi ensaiada sua atividade sob condições ótimas.	74
Gráfico 24	Determinação da estabilidade térmica do extrato enzimático bruto para atividade de sacarase. O extrato enzimático bruto foi mantido por 30 minutos em diferentes temperaturas em tampão acetato de sódio pH 4,0 e 50mM. Após foi determinada a atividade de sacarase sob condições ótimas.	75
Gráfico 25	Determinação da atividade de levanasacarase num meio ajustado a diferentes valores de pH, diferentes tempos de fermentação, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).	76
Gráfico 26	Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com pH 4,0, 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 30°C ((■) Sacarose não estéril sem adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose não estéril e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose estéril e adição de cloranfenicol, (▼) Sacarose estéril sem adição de cloranfenicol).	78

Gráfico 27	Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com pH 5,0, 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 30°C ((■) Sacarose não estéril sem adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose não estéril e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose estéril e adição de cloranfenicol, (▼) Sacarose estéril sem adição de cloranfenicol).	78
Gráfico 28	Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 4°C ((●) Sacarose estéril e pH 4,0, (■) Sacarose não estéril e pH 4,0, (▲) Sacarose não estéril e pH 5,0, (▼) Sacarose estéril e pH 5,0).	78
Gráfico 29	Comparação dos melhores resultados obtidos nos testes anteriores. Os brancos de reação também foram feitos. ((■) Sacarose não estéril, pH 4,0, T = 30°C e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose não estéril, pH 5,0, T = 30°C e adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose estéril, pH 4,0, T = 4,0°C).	79
Gráfico 30	Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e temperatura de reação (°C).	84
Gráfico 31	Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e tempo de reação (horas).	85
Gráfico 32	Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da temperatura de reação (°C) e tempo de reação (horas).	86
Gráfico 33	Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e pH.	87
Gráfico 34	Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos do tempo de reação (horas) e pH.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos produtores de levana	24
Tabela 2	Metodologias utilizadas para determinação da atividade aparente de hidrólise de sacarose.	34
Tabela 3	Metodologias utilizadas para determinação da atividade aparente de formação de levana	35
Tabela 4	Valores de absorbância de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 a 570nm, utilizando meio sintético acrescido de 20,0g/L de sacarose inicial após pré-fermentação a 30°C e 200rpm, por 24horas.	101
Tabela 5	Valores de absorbância a 540nm amostras contendo diferentes concentrações de frutose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi-Nelson.	102
Tabela 6	Valores de absorbância a 490nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Dubois et al. (1956).	103
Tabela 7	Valores de absorbância a 540nm de amostras contendo diferentes concentrações de frutose (umol/ml) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi-Nelson.	104
Tabela 8	Valores de absorbância a 500nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (umol/ml) para a confecção da curva de calibração pelo método Glicose- Oxidase- Peroxidase.	105
Tabela 9	Ensaio enzimático para a produção de levana utilizando o extrato enzimático bruto e sacarose 20% sob diferentes condições de reação.	57
Tabela 10	Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a determinação dos melhores parâmetros para a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase (Y_I) de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	58

Tabela 11	Matriz do delineamento fracionado 3^{4-0} contemplando as 81 combinações realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para a resposta Y_I , utilizando extrato enzimático bruto de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em tampões acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0) e MES (pH 6,0) 50mM com diferentes concentrações de sacarose, tempo e temperaturas de reação.	81
Tabela 12	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta atividade de formação de levana (Y_I), utilizando o extrato enzimático bruto produzido por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 em meio contendo 200g/L de sacarose acrescido de sais minerais, temperatura de incubação de 30°C, agitação de 200rpm, pH inicial de 7,0 e 12 horas de fermentação.	83
Tabela 13	Efeito do Congelamento sobre a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto produzido por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	88

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE EQUAÇÕES	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE TABELAS	15
1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
2 – OBJETIVOS	21
2.1 – Objetivo Geral	21
2.2 – Objetivos Específicos	21
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 - Biopolímero Levana	23
3.2 - <i>Zymomonas mobilis</i>	25
3.2.1 - Identificação do Microrganismo	25
3.2.2 - Características Morfológicas e Fisiológicas do Microrganismo	26
3.2.3 - Metabolismo dos Carboidratos	27
3.3 – Sacarase (E.C. 3.2.1.48) e Levanasacarase (E.C. 2.4.1.10)	30
3.3.1 - Microrganismos Produtores da Enzima Levanasacarase	32
3.3.2 - Metodologias para Determinação da Atividade Aparente de Hidrólise de Sacarose e Formação de Levana	33
3.3.3 - Condições para Produção da Levanasacarase	33
3.3.4 – Propriedades Bioquímicas e Físico-Químicas da Levanasacarase	38
3.3.5 - Síntese de Levana	43
3.3.6 - Determinação dos Valores de K_M e V_{Max}	44
4 - MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 – Microrganismo	45
4.2 - Meios de Cultura	45
4.2.1 - Meio de Manutenção da Cultura	45

4.2.2 - Meio para Pré-Fermentação	45
4.2.3 - Meio de Fermentação	46
4.3 – Condições de Fermentação	46
4.3.1 - Preparo do Pré-Inóculo	46
4.3.2 - Pré – Fermentação	46
4.3.3 – Fermentação	47
4.3.3.1 - Padronização do Inóculo	47
4.3.3.1.1 - Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	47
4.3.3.2 – Fermentação	48
4.4 – Métodos	49
4.4.1 – Processo Fermentativo	49
4.4.1.1 – Coleta e Preparo das Amostras	50
4.4.1.2 – Determinação do pH	50
4.4.1.3 – Estimativa da Biomassa	50
4.4.1.4 – Determinação de Levana	51
4.4.1.5 – Determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)	51
4.4.1.6 - Atividade Enzimática de Hidrólise de Sacarose	52
4.4.1.7 - Atividade Enzimática Aparente de Formação de Levana	52
4.4.1.8 – Cálculos dos Parâmetros Cinéticos	53
4.4.1.8.1 - Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido	53
4.4.1.8.2 - Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido	53
4.4.1.8.3 – Produtividade	53
4.4.2 - Caracterização do Extrato Enzimático quanto à Atividade de Hidrólise de Sacarose	54
4.4.2.1 - Determinação do Período de Incubação	54
4.4.2.2 - Determinação do pH Ótimo	54
4.4.2.3 - Determinação da Temperatura Ótima	55
4.4.2.4 – Efeito da Concentração de Sacarose	55
4.4.2.5 - Determinação da Estabilidade ao pH	55
4.4.2.6 - Determinação da Estabilidade Térmica	56

4.4.3 - Caracterização da Levanasacarase quanto à Atividade de Formação de Levana	56
4.4.3.1 - Testes preliminares realizados para a produção de levana	56
4.4.3.1.1 – Coloração de Gram	57
4.4.3.2 - Caracterização da levanasacarase do extrato bruto ajustando os parâmetros envolvidos pela metodologia de superfície de resposta	58
4.4.3.3 – Estabilidade ao Congelamento	59
4.4.3.4 – Efeito de íons metais	59
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 - Efeito do pH Inicial do Meio de Fermentação na Produção de Levana por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	60
5.2 - Produção de Levanasacarase e Sacarase Extracelulares com Atividade de Hidrólise de Sacarose em diferentes valores de pH iniciais.	65
5.2.1 - Caracterização do Extrato Enzimático quanto à Atividade Sacarase	68
5.2.1.1 - Determinação do Período de Incubação	68
5.2.1.2 - Determinação do pH Ótimo	70
5.2.1.3 – Determinação da Temperatura Ótima	71
5.2.1.4 – Efeito da Concentração de Sacarose	73
5.2.1.5 - Determinação da Estabilidade ao pH	74
5.2.1.6 - Determinação da Estabilidade Térmica	75
5.3 - Produção de levanasacarase em meio com diferentes valores de pH iniciais.	76
5.3.1 - Caracterização da levanasacarase quanto à atividade de formação de levana	77
5.3.1.1 – Testes preliminares realizados para a produção de levana	77
5.3.1.2 – Caracterização da levanasacarase do extrato bruto ajustando os parâmetros envolvidos pela metodologia de superfície de resposta	79
5.3.1.3 - Estabilidade ao Congelamento	88
5.3.1.4 - Efeito de alguns Íons Metálicos	89
6 – CONCLUSÕES	90
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8 – ANEXOS	100

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As enzimas isoladas ou purificadas são utilizadas como catalisadores de reações em uma área chamada biocatálise. Elas são extremamente ativas, versáteis e realizam grande variedade de transformações sob condições brandas e de maneira seletiva.

Atualmente a biocatálise concorre com a rota química já otimizada para a produção de compostos industrialmente importantes, substituindo-a gradativamente, devido à grande demanda de compostos naturais biodegradáveis que não causam danos ao meio ambiente.

O microrganismo *Zymomonas mobilis* possui um mecanismo enzimático muito simples para a produção de levana. Estudos relacionados ao metabolismo de sacarose deste microrganismo revelaram que estão presentes três enzimas que hidrolisam a sacarose, a enzima sacarase intracelular (SacA ou InvA), a enzima levanasacarase extracelular (SacB) e a enzima sacarase extracelular (SacC ou InvB). A função da enzima sacarase intracelular (SacA) ainda não é bem esclarecida. A enzima sacarase extracelular (SacC) contribui com 60% do processo de hidrólise de sacarose, mas não catalisa a polimerização de frutose em levana e nem a degradação do biopolímero. A enzima levanasacarase é responsável pela hidrólise da sacarose e pela formação de levana.

A levana é um polissacarídeo de grande interesse comercial, muito versátil e está formado de unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 6). Em alimentos pode ser usado como fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante em géis para sobremesas, em temperos prontos para salada, em pudins, sorvetes e derivados do leite, em bebidas e como invólucro de embutidos ou em medicina como substituto do plasma sanguíneo, imunomodulador, anticarcinogênico e ainda como agente hipocolesterolêmico. Sabendo-se que existe a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas que viabilizem a produção de levana, este trabalho determinou os melhores parâmetros para a produção do biopolímero levana e do extrato enzimático, durante a fermentação da sacarose pelo microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494, e caracterizou o extrato enzimático quanto à atividade de hidrólise de sacarose e de formação de levana.

2- OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Determinar os melhores parâmetros para a produção do biopolímero levana e do extrato enzimático, durante a fermentação da sacarose pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, e caracterizar este extrato quanto suas atividades de hidrólise de sacarose e de formação de levana (enzima levanasacarase).

2.2 - ESPECÍFICOS

2.2.1 - Produção de levana e do extrato enzimático por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em meio contendo sacarose.

- Verificar o efeito de diferentes pH iniciais no meio de fermentação (5,0, 6,0 e 7,0) para a produção de levana e do extrato enzimático com atividade de sacarase e de formação de levana (enzima levanasacarase), durante 96 horas de incubação.
- Acompanhar o consumo de carboidratos nas diferentes condições de cultivo propostas.

2.2.2 - Caracterização do extrato enzimático bruto quanto à atividade de sacarase.

- Testar o efeito de diferentes tampões na concentração 0,05M com valores de pH variando de 3,52,5 até 7,0 e determinar o pH ótimo.
- Testar o efeito da variação da temperatura (20, 25, 30, 35, 40, 45°C) e determinar a temperatura ótima.

- Testar o efeito da concentração de sacarose (1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5 %).
- Testar a estabilidade do extrato enzimático bruto frente a diferentes valores de pH (4,0 a 7,0).
- Testar a estabilidade térmica do extrato enzimático (25, 30, 35, 40 e 45°C).

2.2.3 - Caracterização do extrato enzimático bruto quanto à atividade de levanasacarase.

- Verificar a inibição do crescimento de células bacterianas durante a produção de levana utilizando sacarose estéril, antibiótico cloranfenicol e baixa temperatura de reação.
- Determinar os melhores parâmetros para a maior atividade de formação de levana da enzima levanasacarase, presente no extrato enzimático bruto.
- Aplicar a metodologia de superfície de resposta, utilizando o planejamento fatorial 3^{4-0} , para testar as variáveis independentes: concentração de sacarose, temperatura de reação, tempo de reação e pH do meio reacional.
- Determinar a estabilidade ao congelamento durante 3 meses.
- Determinar o efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática (CaCl_2 , KCl e MgSO_4).

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Biopolímero Levana

Na natureza são encontrados apenas dois tipos de frutana, ou seja, a inulina e a levana. A primeira geralmente é encontrada em plantas e possui centenas de unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 1) (SUZUKI e CHATTERTON, 1993; HAN, 1989).

A levana conhecida há muitos anos é formada por reações de transfrutossilação e está basicamente constituída de unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 6). Pode ser linear ou ramificada em graus variados no carbono 1, com massas moleculares entre 20kDa (Quilodaltons) e vários Mda (Mega Daltons)(Figura 1).

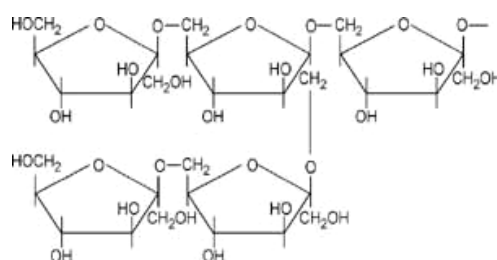


Figura 1 – Estrutura Química da Levana (ERNANDES, 2006)

A levana de baixo peso molecular pode também ser encontrada em plantas. Todavia, a levana de alto peso molecular é produzida principalmente por microrganismos quando cultivados em meio com sacarose (Tabela 1)

Quando produzido por diferentes microrganismos, o biopolímero levana não possui propriedades idênticas, visto que o tamanho das estruturas poliméricas e o grau de ramificações são diferentes.

Segundo Swings e De Ley (1977), este biopolímero não é produzido a partir da glicose, frutose ou mistura de ambas.

Tabela 1 - Microrganismos produtores de levana.

Microrganismos produtores de levana	Pesquisadores
<i>Acetobacter suboxydans</i>	Thachenko e Sevryugina (1989)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Hernandez et al. (1995)
<i>Bacillus mesentericus</i>	Dedonder e Noblesse (1953); Dedonder (1966); Euzenat et al. (1997)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Tkachenko e Sevryugina (1989); Han e Clarke (1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	Dedonder (1966); Chambert et al. (1974)
<i>Erwinia herbicola</i>	Keith et al. (1991)
<i>Mycobacterium</i> sp.	Cha et al. (2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Pseudomonas lindneri</i>	Hettwer et al. (1995); Gibbs e Demoss (1954)
<i>Serratia</i> sp.	Kojima et al. (1993)
<i>Streptococcus salivarius</i>	Lyness e Doelle (1983); Han e Watson (1992)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Dawes et al. (1966); Lyness e Doelle (1983); Reiss e Hartmeier (1990); Côté e Ahlgren (1993)

Fonte: Ernandes e Garcia-Cruz (2005). Adaptada.

Este polissacarídeo pode ser produzido e formar uma cápsula ou ser secretado diretamente no meio de cultivo, sendo usado pelos microrganismos como mecanismo de defesa ou como reserva de substrato (DADDS; MARTIN; CARR, 1973).

O biopolímero levana é pouco viscoso, biologicamente ativo, não tóxico (CALAZANS et al., 1997) e devido sua baixa viscosidade e alta solubilidade em água pode ser substituto da goma arábica. Entretanto, sua aplicação é dificultada por sua baixa produção (ANANTHALAKSMY e GUNASEKARAN, 1999; SUTHERLAND, 1998).

Na indústria alimentícia a levana pode ser empregada como fixador de cores e sabores, espessante, adoçante, estabilizante em géis para sobremesas, em temperos prontos para salada, em pudins, sorvetes e derivados do leite, em bebidas, na produção de frutose e ainda como invólucro de embutidos. Nos alimentos funcionais serve como um aditivo de modo a beneficiar o funcionamento do trato intestinal (UEDA et al., 1994).

Na área da saúde apresenta propriedades terapêuticas, por exemplo, como substituto de plasma sanguíneo (TKACHENKO e SEVRYUGINA, 1989), imunomodulador, anticarcinogênico (CALAZANS et al., 1997) e como agente hipocolesterolêmico

(LIEPA et al.,1993). Também foi observado que possui efeitos anti-inflamatório em peles irritadas e de proliferação celular em pele bio-artificial, indicando sua possível aplicação como agente cosmecêutico (KIM et al., 2005).

O interesse comercial no biopolímero levana tem incitado pesquisas para a identificação de novos microrganismos produtores eficientes e para a otimização do processo de produção em larga escala (KEITH et al., 1991; HARTMEIER et al., 1994). Estudos sobre a síntese de levana por *Zymomonas mobilis* (YANASE et al., 1992), *Streptococcus salivarius* (SONG e JACQUES, 1999) e *Bacillus subtilis* (CHAMBERT; GONZY-TRÉBOUL; DEDONDER, 1974) tem sido realizados.

3.2 - *Zymomonas mobilis*

3.2.1 - Identificação do Microrganismo

Barker e Hillier (1911) foram os primeiros a estudar a bactéria *Zymomonas*, responsável pela deterioração do sabor e do *flavour* de bebidas fermentadas, porém foi atribuída a identificação desta bactéria a Lindner (1924). Este, em 1928, deu o nome a seu isolado de *Termobacterium móbile* (WENDT, 2001). A bactéria foi posteriormente denominada *Pseudomonas lindner* por Kluyver e Hoppenbrouwers (1931). Kluyver inseriu o gênero na 7ª edição do Bergey's Manual (1957), propondo duas espécies: *Zymomonas mobilis* e *Zymomonas anaerobia* (MORTATTI, 1985).

Em 1970, a bactéria gram-negativa *Z. mobilis* foi descoberta como a mais rápida e eficiente produtora de etanol quando crescida em meio contendo sacarose, glicose ou frutose.

3.2.2 - Características Morfológicas e Fisiológicas do Microrganismo

As colônias de *Zymomonas mobilis* quando crescidas em meio contendo sacarose são circulares, lisas, de cor creme ou da cor do meio, com consistência pastosa. De acordo com sua morfologia celular, possuem de 2 a 6µm de comprimento e de 1 a 4µm de diâmetro, geralmente agrupadas aos pares e não formam esporos. Na maioria das vezes são móteis, tendo de um a quatro flagelos e sua motilidade pode ser perdida espontaneamente. Em mosto de melaço (1 litro de mosto de melaço de cana com 15 a 20°Brix; 1g de $\text{HPO}_4(\text{NH}_4)_2$; 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5,0) ou em melaço agar (meio contendo mosto de melaço acrescido de 1,5% de agar) as células, inicialmente “normais”, podem dar origem, ao envelhecerem, a formas pleomórficas, constituídas de filamentos longos, com 10 a 80µm de comprimento, ou mesmo mais, apresentando, geralmente, uma típica dilatação nas extremidades (MORAIS, 1983).

A biomassa microbiana de *Zymomonas mobilis* está composta principalmente de carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e água. Na região média do espectro de Infravermelho (IR) mostra bandas características de absorção, permitindo, dessa forma, o monitoramento do processo fermentativo. Em 2002, Grube et al. realizaram análises quantitativas de amostras de biomassa de *Z. mobilis* 113S, através de IR, em diferentes fases do crescimento, em meio contendo sacarose ou glicose. Nas primeiras 24 horas de fermentação, houve o crescimento das células bacterianas. Em meio com sacarose, a concentração de carboidrato total foi mais alta, enquanto o conteúdo de proteína foi maior no meio com glicose.

No segundo estágio da fermentação, no meio com sacarose, ocorreu a formação de carboidratos extracelulares, com a diminuição do conteúdo de carboidratos intracelulares, o que está ligado à intensa síntese de levana. Observaram também que a produção de levana excedeu em 46 vezes a concentração de carboidrato intracelular (biomassa). Posteriormente, a biomassa de *Z. mobilis* foi estocada a 4°C. As análises quantitativas do espectro de absorção IR realizadas antes e após a estocagem mostraram que os conteúdos de carboidratos, proteínas e lipídeos mudaram ligeiramente, enquanto a concentração de ácidos nucleicos diminuiu de 16,1 para 13,1% de peso seco absoluto. Houve, portanto, a manutenção do metabolismo nas células microbianas e um ligeiro crescimento celular durante a estocagem, visto que as células microbianas quando jovens possuem um conteúdo de ácidos nucleicos mais alto, o qual diminui com o crescimento (GRUBE et al., 2002).

3.2.3 - Metabolismo dos Carboidratos

Zymomonas mobilis é classificada como um microrganismo anaeróbio, entretanto é capaz de crescer bem sob condições aeróbias. *Zymomonas mobilis* é uma bactéria conhecida por produzir etanol num rendimento superior quando comparado às leveduras usadas tradicionalmente (ROGERS et al., 1982). Para seu crescimento pode utilizar glicose, frutose ou sacarose. Muitas linhagens toleram altas concentrações de açúcar e etanol quando presentes no meio de cultivo, na proporção de 20 a 40% e 7,7 a 10%, respectivamente. O pH e temperaturas ótimas para o seu crescimento são de 7,3 e de 25 a 30°C. (SWINGS e DE LEY, 1977). Entretanto, colônias de *Zymomonas mobilis* também crescem em valores baixos de pH, por exemplo, em pH 4,0.

Quando a bactéria *Zymomonas mobilis* cresce em meio contendo sacarose como fonte de carbono, o rendimento em etanol é consideravelmente reduzido devido à formação de subprodutos, tais como levana, frutooligômeros e sorbitol (VIAKARI, 1984; DOELLE et al., 1993; KANNAN; MUKUNDAN; GUNASEKARAN, 1993; SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999). Por essa razão tem sido sugerido, quando deseja-se produzir etanol na fermentação de *Zymomonas mobilis*, que seja feita a inversão da sacarose previamente para evitar a formação de levana no meio.

Experimentos realizados por Viikari e Gisler em 1986 demonstraram que a baixa proporção de hidrólise de sacarose foi associada à formação de levana e a alta proporção de hidrólise de sacarose à formação de sorbitol.

Segundo Dawes et al. (1966), em meios contendo sacarose, células de *Zymomonas mobilis* N.C.I.B. 8938 utilizam a glicose mais rapidamente do que a porção de frutose e a síntese de levana pára quando a concentração de sacarose no meio de cultivo é de 500µg (1,46µmols/mL). A bactéria *Zymomonas mobilis* dispõe de mecanismos bioquímicos reguladores da produção de levana, como substância de reserva temporária, quando há alta disponibilidade de frutose no caldo de fermentação (TANO e BUZATO, 2002).

Quando *Zymomonas mobilis* cresce em sacarose converte o dissacarídeo em glicose e frutose, usando três enzimas para a quebra da sacarose: uma levanasacarase extracelular (LevU), formadora de levana e glicose; uma sacarase extracelular (InvB), formadora de glicose e frutose (PREZIOSI; MICHEL; BARATTI, 1990; YANASE et al., 1992); e uma

segunda sacarase (InvA) cuja função exata e localização em *Z. mobilis* não é clara. As enzimas levanasacarase e sacarase extracelulares (também conhecidas como SacB e SacC) possuem um alto grau de resíduos de aminoácidos idênticos (SPRENGER, 1996).

O metabolismo de açúcares de *Zymomonas mobilis*, ilustrado na Figura 2, aparece como uma “via metabólica” com algumas ramificações. A sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U), comprovado pela alta atividade de sacarase encontrada no meio de cultura. As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF), e são simultaneamente catabolizados via Entner-Doudoroff, um mecanismo até então conhecido somente em bactérias aeróbias estritas (KERSTERS e DE LEY, 1968). O início do catabolismo ocorre devido à ação de duas enzimas constitutivas, a glucoquinase (EC. 2.7.1.2) e a frutoquinase (EC. 2.7.1.4) as quais fazem a fosforilação de ambos os monossacarídeos na posição 6.

A enzima glucoquinase está sob controle de nucleotídeo (DOELLE, 1982) e a enzima frutoquinase parece ser regulada principalmente pelo acúmulo de glicose interna. Essa última enzima tem a capacidade de fosforilar altas concentrações de frutose, indicando que o transporte de açúcar monomérico e sua subsequente fosforilação devem seguir sistemas de controles regulatórios diferentes. Os diferentes controles de transporte e catabolismo permitem o acúmulo de um ou ambos os açúcares monoméricos dentro e fora das células sob condições por meio das quais a hidrólise de sacarose é mais alta quando comparada a atividade catabólica. Isso suporta a teoria que as enzimas catabólicas ou taxas metabólicas determinam a taxa da utilização do açúcar monomérico (CROMIE e DOELLE, 1982). Consequentemente é a atividade catabólica e não a atividade de hidrólise de sacarose que limita a taxa de formação de etanol.

Uma outra alternativa é a conversão das duas hexoses formadas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) que existe apenas na bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR, que está localizada no periplasma, oxida glicose a glicanolactona e reduz frutose a sorbitol. Glicanolactona é, então, convertida pela glicanolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (SPRENGER, 1996). A enzima levanasacarase extracelular catalisa a reação de transfrutossilação para acumular levana, resultando em uma diminuição no rendimento de etanol.

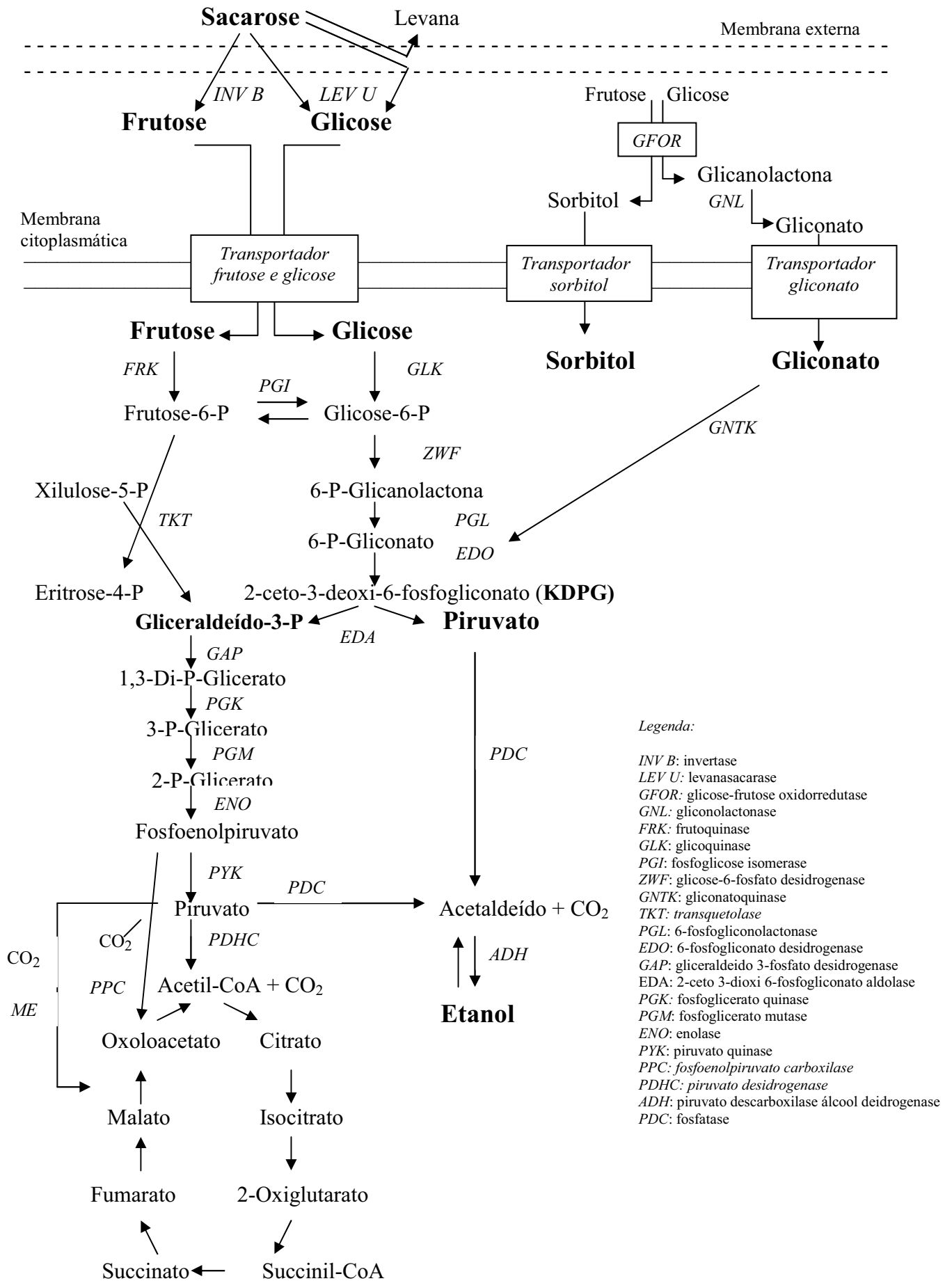


Figura 2 - Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis*. Fonte: Sprenger (1996).

Segundo Doelle et al. (1993), *Zymomonas mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura extremamente peculiares, causando um grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial. Os autores afirmam que a habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos a tornam um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos.

3.3 – Sacarase (E.C. 3.2.1.48) e Levanasacarase (E.C. 2.4.1.10)

Estudos relacionados ao metabolismo de sacarose em *Z. mobilis* revelaram que estão presentes três enzimas que hidrolisam a sacarose, ou seja, a sacarase intracelular, a sacarase e a levanasacarase extracelulares.

A enzima sacarase intracelular ainda não tem sua função bem esclarecida devido à ausência de um mecanismo de transporte para sacarose, uma vez que a difusão facilitada ou transporte ativo da sacarose igual ao que foi descrito para outras bactérias Gram-negativas não foi observado em *Zymomonas mobilis*.

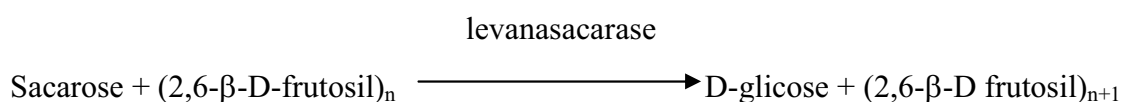
Existem estudos no qual a enzima SacA da linhagem ZM4 de *Z. mobilis* tem sido purificada e caracterizada, como uma tentativa de melhor entendimento de sua função no metabolismo de sacarose desse microrganismo. Para essa finalidade, o gene de SacA de *Zymomonas mobilis* foi previamente clonado e expresso em *E. coli*, de acordo com a metodologia de Gunasekaran et al. (1990). Observaram que a enzima foi ativa na faixa de temperatura entre 5°C e 30°C e pH entre 4,5 e 8,5, com a temperatura ótima de 25°C e pH ótimo de 6,5 (AIT-ABDELKADER et al., 2000).

A enzima sacarase extracelular (SacC ou InvB) tem uma alta atividade específica de hidrólise de sacarose, entretanto não catalisa a polimerização de frutose em levana e nem a degradação de polifrutoses. Yanase et al. (1995) determinaram que a enzima sacarase extracelular purificada e cristalizada, produzida por *Zymomonas mobilis* Z6C, um mutante espontâneo da linhagem *Zymomonas mobilis* IFO, é uma proteína ácida com ponto isoelétrico em pH 3,2, peso molecular entre 58 e 68kDa possuindo especificidade estrita para o substrato sacarose.

A enzima levanasacarase extracelular (SacB), relatada pela primeira vez por Dawes et al. (1966), é induzida durante as fases lag e de crescimento do microrganismo, sendo responsável pela hidrólise da sacarose e também pela formação de levana. A habilidade de hidrolisar a sacarose não é comum em *Zymomonas mobilis*, entretanto foi descoberto que as linhagens que possuem essa capacidade de hidrólise possuem a enzima levanasacarase (EC 2.4.1.10) envolvida no processo.

Kim et al. (2001) relataram que a enzima levanasacarase contém dois sítios de ligação de substratos, um para levana e outro para sacarose, permitindo, dessa maneira, a formação de mais de um produto pelas atividades transferase e hidrolase. Esta enzima catalisa três reações características: i) síntese de levana a partir da sacarose por reação de transfrutossilação, liberando glicose, ii) hidrólise da levana, com formação de frutose e iii) troca do [^{14}C]glicose na reação frutose-2,1-glicose + [^{14}C]glicose para frutose-2,1- ^{14}C]glicose + glicose (HETTWER; GROSS; RUDOLPH, 1995).

A conversão da sacarose em frutanas com pontes β (2 $\rightarrow$ 6) ocorre devido à transferência, catalisada pela enzima levanasacarase extracelular (EC 2.4.1.10), do radical fructosil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor formando a cadeia da levana. Segundo Ammar et al. (2002), a enzima fructosiltransferase ou levanasacarase (2,6- β -D-frutana-6- β -D-fructosiltransferase, E.C. 2.4.1.10) catalisa a seguinte reação:



Além das moléculas de frutose, alguns compostos presentes no meio de fermentação, tais como levana, sacarose, água, álcoois, e mono ou oligossacarídeos, também podem servir como aceptores de radicais fructosil da sacarose (HESTRIN e AVIGAD, 1958).

Na presença de alguns sacarídeos como aceptores, a enzima levanasacarase sintetiza também frutooligossacarídeos. A formação de frutoooligossacarídeos, por reação de transfrutossilação em um meio contendo sacarose catalisada por levanasacarase, foi encontrada em diferentes microrganismos, tais como em *Aerobacter levanicum* (HESTRIN; FEINGOLD; AVIGAD, 1956; HESTRIN e AVIGAD, 1958), *Bacillus subtilis* (TANAKA et al., 1981) e em *Zymomonas mobilis* (CRITTENDEN e DOELLE, 1993).

Tkachenko e Sevryugina (1989) relataram que, em um meio contendo sacarose, foi encontrada 83% da atividade enzimática total, produzida por *B. polymyxa* (linhagem LU), quando as células entram na fase logarítmica de crescimento e um nível relativamente baixo de atividade de levanasacarase. Quando a bactéria alcança a fase estacionária, não foi detectada a atividade de levanasacarase associada às células, concluindo-se que a enzima produzida é uma enzima extracelular.

Dawes et al. (1966) determinaram a atividade de levanasacarase, utilizando os extratos brutos produzido por *Zymomonas mobilis*, e observaram que aproximadamente 10 % da sacarose é convertida em levana e o restante é hidrolisada, com a formação de glicose e frutose. Portanto a formação de levana não ocorre em uma taxa linear.

Segundo Song et al. (1993) e Song e Rhee (1994), as enzimas levanasacarases possuem massas molares entre 45 e 64kDa, exceto as enzimas de mutantes *S. salivarius* e *Streptococcus*, com massas molares de 140kDa (JACQUES, 1993) e a enzima de *Lactobacillus* que possui massa molar de 90kDa (VAN HIJUM et al., 2001).

A atividade da enzima levanasacarase está envolvida em uma ampla variedade de processos desde a sobrevivência de bactérias no solo (*Bacillus subtilis*) até fitopatogêneses (espécies de *Erwinia* e *Pseudomonas*) ou simbiose (*Bacillus polymyxa*) em plantas que interagem com bactérias (HERNANDEZ et al., 1995). As enzimas levanasacarases de diferentes origens diferem amplamente em suas características e propriedades (HETTWER; GROSS, RUDOLPH, 1995).

3.3.1 - Microrganismos Produtores da Enzima Levanasacarase

A enzima levanasacarase pode ser produzida por diversas bactérias, tais como *Pseudomonas* ssp, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (HETTWER; GROSS, RUDOLPH, 1995), *Acetobacter aceti*, *Aerobacter levanicum*, *Bacillus natto's*, *Bacillus polymyxa* (KOJIMA et al., 1993), *Lactobacillus reuteri* linhagem 121 (VAN HIJUM et al., 2001), *Leuconostoc mesenteroides* (KANG et al., 2005), *Rahnella aquatilis* JCM-1683 (OHTSUKA et al. 1992), *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*. Entretanto, as enzimas mais estudadas são aquelas

produzidas por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*, devido a sua alta capacidade de produção de levana (COTÉ; AHLGREN, 1993). Além destes, muitos outros microrganismos cultivados sob condições adequadas de fermentação são produtores da enzima levanasacarase e podem ter potencial para produzir levana em escala industrial (MATOON et al., 1955; HESTRIN; FEINGOLD; AVIGAD, 1958; YAMAMOTO et al., 1985; IIZUKA et al., 1991).

3.3.2 - Metodologias para Determinação da Atividade Aparente de Hidrólise de Sacarose e Formação de Levana.

As características dos diferentes métodos utilizados para as determinações de atividades de hidrólise de sacarose e de levanasacarase estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

3.3.3 - Condições para Produção da Levanasacarase

Segundo Ananthalaksmi e Gunasekaran (1999), durante o processo fermentativo do microrganismo *Zymomonas mobilis* B-4286, a produção de levanasacarase foi mais alta a 25°C (148U/mg de massa celular), entretanto, com o aumento da temperatura de fermentação para 40°C, houve uma diminuição na produção de enzima (26U/mg de massa celular). Por outro lado, a quantidade de enzima com atividade de hidrólise de sacarose aumentou de 1,3-1,7U/mg de massa celular quando a temperatura foi aumentada de 25 para 35°C e diminuiu para 1,3U/mg de massa celular quando se utilizou 40°C.

A manutenção do pH do meio de fermentação contendo sacarose acima de 5,5 é importante, visto que o pH ótimo da levanasacarase está entre 5,5 e 7,0 e a levana pode ser hidrolisada em valores de pH baixo (AVIGAD, 1968).

Tabela 2 – Metodologias utilizadas para determinação da atividade aparente de hidrólise de sacarose.

Autores	Composição da Mistura de Reação	Temperatura de Incubação (°C)	Tempo de Incubação (minutos)	Metodologia para Determinação de Açúcares Redutores	Definição da Unidade de Atividade de Sacarase (U.A.)
Ammar et al. (2002).	0,5mL de enzima levanasacarase + 0,5mL de sacarose 20% (p/v) em tampão universal Robinson's e Britton pH 6,0.	50	10	Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima que produz 1µmol de glicose por minuto sob condições padrão.
Sangiliyandi e Gunasekaran (2001)	100µL de extrato enzimático + 200µL de sacarose 1M + 700µL de tampão acetato de sódio pH 5,0	60	30	Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima requerida para liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto.
Ananthalaksmi e Gunasekaran (1999)	25µL de extrato enzimático + 250µL de sacarose 1M + 725µL de tampão acetato de sódio pH 5	30	30	Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima requerida para liberar 1µg de glicose em 1minuto sob condições experimentais.
Iizuka et al. (1993)	0,5mL de sacarose 20% + 0,5mL de enzima levanasacarase em tampão acetato 0,02M pH 6,0.	30	10	Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima que produz 1µmol de açúcar redutor como glicose por minuto sob condições padrão.
Yanase et al. (1991; 1992)	Sacarose 0,15M em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 + solução de enzima sacarase extracelular = 1mL.	30	10	Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima que produz açúcares redutores equivalentes a 1µmol de glicose por minuto.
Ohtsuka et al. (1992).	Sacarose 10% + tampão McIlvaine pH 6,0 + enzima levanasacarase = 2,0mL.	30	30	Após aquecimento a 100°C, a glicose liberada foi quantificada pelo método glicose-oxidase.	Quantidade de enzima que produz 1µmol de glicose por minuto sob condições padrão.
Yanase et al. (1992).	Sacarose 10% em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 + solução de enzima levanasacarase = 1mL.	30		Somogyi e Nelson	Quantidade de enzima que produz açúcares redutores equivalentes a 1µmol de glicose por minuto.

Tabela 3 – Metodologias utilizadas para determinação da atividade aparente de formação de levana.

Autores	Composição da Mistura de Reação	Temperatura de Incubação (°C)	Tempo de Incubação (horas)	Metodologia para Determinação da Levana Formada	Definição da Unidade de Atividade de Levanasacarase
Kang et al. (2005)	Sacarose 100mM + tampão acetato de sódio 20mM pH 6,0 + levanasacarase (M1FT).	Temperatura controlada.	Tempos pré-definidos.	Determinação da glicose liberada pelo Kit de análise enzimática ou por cromatografia de camada delgada (TLC) após adição de NaOH 25mM.	Quantidade de enzima requerida para liberar 1μmol de glicose por minuto.
Jang et al. (2001)	0,3U de solução de enzima levanasacarase + sacarose 10% em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 = 1mL	4	6-70	Após a adição de NaOH 20mM, os monossacarídeos glicose e frutose, os oligossacarídeos e a levana formada, foram determinados por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência).	Quantidade de enzima que libera 1μmol de glicose por minuto.
Sangiliyandi e Gunasekaran (2001)	100μL de extrato enzimático + 200μL de sacarose 1M + 700μL de tampão acetato de sódio pH 5,0	60	0,5	Hidrólise da levana formada de acordo com Viikari e Gisler (1986)	Quantidade de enzima requerida para produzir 1μmol de levana, como unidades de frutose, em um minuto.
Ananthalaksmi e Gunasekaran (1999).	25μL de extrato enzimático + 250μL de sacarose 1M + 725μL de tampão acetato de sódio pH 5	30	2	A turbidez foi medida espectrofotometricamente em 540nm. A quantidade de levana formada foi calculada utilizando uma curva padrão de absorbância x concentração de levana purificada de <i>Erwinia herbicola</i> (Sigma Co., USA).	Quantidade de enzima requerida para produzir 1μg de levana em 1minuto sob condições experimentais.
Tkachenko e Sevryugina (1989)	2mL de preparação enzimática + 2mL de solução de sacarose 10% em tampão fosfato 0,2M pH 6,6 + cloranfenicol.	30	22	Densidade óptica da mistura reacional.	Quantidade de enzima que mudou a densidade óptica da solução em 0,01 dentro de uma hora.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) determinaram as atividades de hidrólise de sacarose e de formação de levana dos extratos enzimáticos, produzidos por *Zymomonas mobilis* e seus mutantes ZML1 e ZML2, em diferentes tempos de fermentação, em um meio contendo sacarose. Observaram que os mutantes ZML1 e ZML2 exibiram mais que o dobro da atividade de levanasacarase, 30,6 e 36U/mg, respectivamente, em relação à linhagem parental, 12,6U/mg, em 24horas de fermentação. Também exibiram atividades de hidrólise de sacarose maiores, 68 e 71 U/mg, respectivamente, do que a linhagem parental, 55,7U/mg. Em 24horas de fermentação, a relação de atividade de formação de levana e atividade de hidrólise de sacarose (L/S) nos mutantes ZML1 e ZML2 foram de 0,46 e 0,55, respectivamente, valores que são quase duas vezes maiores que o encontrado para a linhagem parental (0,22). Estes resultados indicaram que a enzima responsável pela atividade de formação de levana (levanasacarase) foi superproduzida nos mutantes.

O acúmulo de levana no meio obviamente pode ser influenciado pela quantidade de levanasacarase secretada. Uma ampla variedade de compostos químicos (aromáticos, xenobióticos, álcoois, alcanos, etc.) é geralmente reconhecida como fatores ambientais essenciais para induzir mudanças estruturais e funcionais que são relacionados à capacidade de um composto particionar na membrana citoplasmática de bactérias. Essas substâncias são majoritariamente anfífilas, ou seja, cada uma contém uma região hidrofílica e hidrofóbica na molécula reproduzindo, portanto, propriedades similares da membrana glicerosfolipídica e proteínas (DENICH et al., 2003). A afinidade dos compostos anfífilos por membranas de bactérias depende de seu tamanho molecular e seu grau de hidrofobicidade.

Zikmanis et al. (2005) examinaram o efeito de álcoois aromáticos (benzil e fenetil) e alifáticos (n-butanol e n-hexadecanol), anestésicos (procaína) e surfactantes (Tween 20 a Tween 80) na secreção de levanasacarase, produzida pela linhagem *Zymomonas mobilis* 113S. Durante a incubação das células com sacarose 10mM e com os compostos anfífilos, observaram um decréscimo da atividade de levanasacarase, concomitantemente com um aumento da quantidade de proteína total no meio. Visto que nenhum dos compostos estudados exibiu efeito sobre a atividade da enzima *in vitro*, pode-se verificar que os mesmos agiram diferentemente quanto aos processos de secreção de levanasacarase e proteína total associados à membrana de *Zymomonas mobilis*.

Cote (1988) estudou o crescimento de *Erwinia herbicola* e a produção de levanasacarase em diferentes meios de fermentação. Ao comparar as densidades celulares obtidas nos meios testados, observou uma defasagem na concentração celular, quando a fonte de

carbono utilizada foi a frutose. Esta defasagem no crescimento refletiu no retardamento da produção de levanasacarase e na mudança de pH do meio de cultura, quando o substrato era frutose. Quando a glicose foi usada como fonte de carbono, após a fase estacionária obteve-se a quantidade máxima de levanasacarase, mas depois a taxa de produção caiu para zero. Declínios na atividade da levanasacarase foram também observados para as outras fontes de carbono, mas não tão marcantes quanto à do meio com glicose. Os maiores níveis de levanasacarase extracelular foram produzidos num meio a base de água de maceração de milho e sorbitol, alcançando uma atividade de aproximadamente 0,7U/mL. A água de maceração de milho tem sido utilizada há muitos anos para aumentar a produção de vários produtos extracelulares, inclusive na síntese de levanasacarase. A produção máxima de levanasacarase coincidiu com a produção máxima de massa celular e ocorreu na concentração de 1,2 a 1,5% de água de maceração por volume.

Vários autores têm estudado a purificação da enzima levanasacarase produzida por diferentes microrganismos. Ohtsuka et al. (1992) e Hettwer et al. (1995) purificaram e caracterizaram as enzimas levanasacarases de *Rahnella aquatilis* JCM-1683 e de *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, respectivamente. Em 2001, Van Hijum et al. (2001) purificaram a enzima responsável pela síntese de levana em *Lactobacillus reuteri* linhagem 121.

Kang et al. (2005) purificaram a enzima levanasacarase recombinante de *L. mesenteroides* (M1FT). Para a produção da enzima, a bactéria *Escherichia coli* DH5 α (Promega USA) foi utilizada como linhagem hospedeira para clonagem e expressão do gene (*m1ft*) que codifica a levanasacarase de *L. mesenteroides* B-512 FMC (KIM; ROBYT, 1994). Após o crescimento celular, foi feita a ruptura das células bacterianas e posterior purificação da enzima por cromatografia de coluna de afinidade. Após verificar que dentre os compostos formados, pela reação da enzima purificada com sacarose 150mM, estavam a levana e alguns frutooligossacarídeos (FOS), certificaram-se que a mesma era realmente uma levanasacarase.

Rapoport et al. (1966) relataram o isolamento da enzima levanasacarase em um estado completamente livre de açúcares. Entretanto, Chambert et al. (1974) relataram que a enzima obtida pelo método de Rapoport et al. (1966) apenas mostrava ligeira atividade de síntese de levana, mas possuía uma alta atividade na adição de levana (apud TANAKA et al., 1979).

Lyness e Doelle (1983) purificaram a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis*, pelo tratamento do sobrenadante com sulfato de protamina e posterior cromatografia de troca iônica DEAE-trisacril, obtendo-se uma purificação parcial de 330 vezes e rendimento de 11%.

Vigants et al. (2001) desenvolveram um novo e eficiente método para a purificação da enzima levanasacarase produzida pelo mutante floculante de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. O primeiro passo para a purificação foi a precipitação da enzima, presente no sobrenadante, com MnCl_2 0,1M. Em seguida, foram realizadas uma ultrafiltração e uma cromatografia de troca aniônica. Após os passos de purificação, a enzima levanasacarase exibiu uma atividade de formação de levana de 39,2mg/mL.

Sangiliyand et al. (1999) purificaram a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por uma *E. coli* recombinante. Após a produção da enzima pelo microrganismo recombinante, foi realizada a lise celular para a obtenção de um extrato, no qual a mesma estava presente. Em seguida, esse extrato foi inserido em uma coluna de hidroxapatita e após foi realizada uma eletroforese em gel. A enzima exibiu uma massa molar de 55KDa.

3.3.4 – Propriedades Bioquímicas e Físico-Químicas da Levanasacarase.

A enzima levanasacarase, quando produzida pelos microrganismos *Lactobacillus mesenteroides*, *Bacillus* sp. TH4-2, *Rahnella aquatilis* JCM-1683 e *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, tem pH ótimo de 6,0 para a atividade de formação de levana (KANG et al., 2005; AMMAR et al., 2002; OHTSUKA et al., 1992; HETTWER; GROSS; RUDOLPH, 1995). Entretanto, os valores de pH ótimo encontrados para a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase, quando produzida por diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*, são diferentes, segundo diversos autores. Em 1977, Swings e De Ley determinaram que o pH ótimo para a atividade da enzima levanasacarase é de 6,5, enquanto Sangiliyand et al. (1999), Yanase et al. (1992) e Song et al. (1993) determinaram que os valores ótimos de pH são 5,0 para as enzimas levanasacarases produzidas por *Z. mobilis* Z6C e *E. coli* que possui o gene de *Zymomonas mobilis*, respectivamente. Entretanto, Crittenden e Doelle (1994) determinaram que o valor de pH 5,5 é ótimo para a atividade da enzima produzida por *Z. mobilis* UQM 2716.

Também há divergências quanto aos valores de pH ótimo encontrados para a atividade de hidrólise da sacarose pela enzima levanasacarase, quando produzidas por diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*. Segundo Lyness e Doelle (1983), o pH 6,5 é ótimo para a atividade da enzima levanasacarase, purificada e produzida por *Zymomonas mobilis* NCIB 11199. Entretanto, segundo Yanase et al. (1992), o pH ótimo para a atividade de hidrólise de

sacarose da enzima levanasacarase, produzida por *Z. mobilis* Z6C, está entre 7,0 e 8,0. Sangiliyand et al. (1999) determinaram que o pH 5,0 é ótimo para a atividade de hidrólise de sacarose da enzima produzida pela *E. coli* recombinante.

Em estudos anteriores, tem sido relatado que as enzimas levanasacarases, produzidas por diferentes microrganismos, diferem amplamente em relação à temperatura de ambas as atividades. Segundo Lyness e Doelle (1983), ocorre uma rápida taxa de hidrólise de sacarose em temperaturas mais elevadas e a formação de levana em temperaturas menores.

A enzima levanasacarase recombinante de *Z. mobilis* expressa em *Escherichia coli* tem uma temperatura ótima para produção de levana de 0°C (BELGHITH et al., 1996). Hettwer et al. (1995) relataram que a levanasacarase de *P. syringae* possui a maior atividade de hidrólise de sacarose em 60°C e a atividade máxima para a produção de levana em 18°C. Segundo Sangiliyandi e Gunasekaran (1998), a enzima levanasacarase de *Z. mobilis* de uma *E. coli* recombinante exibiu atividade máxima de hidrólise de sacarose a 60°C, enquanto a atividade de formação de levana foi observada a 30°C. A enzima levanasacarase recombinante de *Z. mobilis* purificada exibiu maiores atividades de formação de levana e de hidrólise de sacarose a 30 e 50°C, respectivamente (SANGILIYANDI et al., 1999). Ohtsuka et al. (1992) determinaram que a atividade de hidrólise de sacarose, da enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM-1683, foi mais alta a 60°C. Para a enzima levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp. TH4-2, a temperatura ótima para reação de hidrólise de sacarose foi de 60°C e a temperatura ótima para produção de levana foi de 50°C (AMMAR et al., 2002). Crittenden e Doelle (1994) relataram que a enzima levanasacarase perdeu irreversivelmente a capacidade de formar levana em 35°C enquanto reteve a capacidade de hidrólise de sacarose. Segundo Yanase et al. (1992), a temperatura ótima para a atividade da enzima levanasacarase purificada, produzida pelo microrganismo *Z. mobilis* Z6C, foi de 50°C, sendo que a baixas temperaturas, tais como 5 e 15°C, a reação de transfrutoseilação foi preferencialmente catalisada ao invés da hidrólise de sacarose, mas o inverso ocorreu em temperaturas mais elevadas, tais como 30 e 40°C. Kang et al. (2005) relataram que a temperatura ótima para formação de levana, pela enzima M1FT, foi de 30°C, e a 50°C levana não foi sintetizada. Sangiliyandi e Gunasekaran (2001), ao estudar o efeito de diferentes temperaturas nas atividades de hidrólise de sacarose e de formação de levana, da levanasacarase selvagem purificada e das levanasacarases mutantes de *E. coli* (pLS3) e (pLS3105), respectivamente, determinaram que a enzima do tipo selvagem (pLS3) exibiu uma atividade de hidrólise máxima a 50°C, enquanto a enzima mutante (pLS3105) exibiu a mesma a

uma temperatura menor de 40°C. Também determinaram que a temperatura ótima para formação de levana, da levanasacarase mutante e da enzima tipo selvagem purificada, é de 30°C.

Portanto, a produção de levana a baixas temperaturas é uma característica atrativa de levanasacarase de *Zymomonas mobilis*, visto que uma baixa temperatura poderia ajudar não apenas a aumentar a estabilidade da enzima durante uma reação enzimática longa, mas também evitar chances de contaminação por microrganismos e a ação de outras enzimas.

Dedonder (1966), ao estudar a enzima levanasacarase produzida por *B. subtilis*, observou que a mesma pode ser conservada a -20°C sem ocasionar nenhuma perda de sua atividade. Entretanto, repetidos congelamentos e descongelamentos resultaram na destruição parcial da atividade. Cote e Imam (1989) também demonstraram que a enzima levanasacarase de *Erwinia herbicola* é estável quando submetida ao congelamento, podendo ser liofilizada e consequentemente reconstituída com pequena perda de sua atividade.

Segundo Ammar et al. (2002), a enzima levanasacarase termoe estável, produzida por *Bacillus* sp. TH4-2, foi estável a uma faixa de pH de 5,5 a 7,0, onde a atividade residual não mudou (100%), e quando a mesma foi incubada por 24 horas em valores de pH de 3,0 a 9,0, reteve mais do que 50% de sua atividade. Sangiliyandi et al. (1999) determinaram que a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por *E. coli* recombinante foi estável em pH de 5,0 a 7,0, sendo inativada em pH 9,0. Yanase et al. (1992) determinaram que a enzima levanasacarase purificada, produzida pelo microrganismo *Z. mobilis* Z6C, foi estável em pH 3,5-6,0 durante 24 horas de incubação a 30°C. A enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM-1683 ficou estável em valores de pH de 5,5 a 9,0 durante 2 horas de incubação a 30°C (OHTSUKA et al. 1992).

Yanase et al. (1992) estabeleceram que a levanasacarase de *Zymomonas mobilis* é estável a 37°C após 30 minutos de pré-incubação em pH 6,0. Sangiliyandi et al. (1999) determinaram que a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por *E.coli* recombinante foi estável a 30°C e reteve mais do que 90% de sua atividade após 6 horas de reação a essa temperatura, enquanto a 50°C e 60°C perdeu rapidamente sua atividade (15 e 6 minutos, respectivamente). A enzima levanasacarase de *Bacillus* sp. TH4-2, segundo Ammar et al.(2002), ficou estável a 50°C após 1 hora de pré-incubação, entretanto a 60°C e 30 minutos de reação, a atividade residual da mesma foi de 50% em relação a inicial. De acordo com Ohtsuka et al. (1992), a enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM-1683 ficou estável até 40°C, mas perdeu completamente sua atividade a 70°C.

A ação da levanasacarase, segundo Lyness e Doelle (1983), é controlada, ainda que de formas distintas, pela concentração de sacarose, glicose e frutose presentes no meio de fermentação. Segundo estes autores, quando a levanasacarase foi utilizada para a produção de levana de alta massa molecular, através de qualquer tipo de enzima invertase que atuava sobre a sacarose, sua ação foi levemente inibida pela glicose. Ainda assim, constataram que a concentração de sacarose é o ponto de maior influência sobre a enzima, uma vez que a hidrólise ocorreu mesmo na presença de elevadas concentrações de glicose, bem como a síntese de levana a partir da frutose resultante.

Lyness e Doelle (1983) observaram que tanto a glicose (5,4g/L) quanto o etanol (73,6g/L) inibiram completamente a atividade da enzima levanasacarase purificada de *Zymomonas mobilis*. Doelle et al. (1993) determinaram que a glicose inibiu a atividade das enzimas levanasacarases de *B. subtilis* e *Actinomyces viscosus*.

Os experimentos desenvolvidos por Euzenat et al. (1997), em soluções com altas concentrações de sacarose, demonstraram a habilidade da enzima levanasacarase de *Bacillus subtilis* C4 transformar quase todo o substrato disponível no meio de reação, catalisando, dessa maneira, a formação simultânea de levana e frutooligossacarídeos.

Segundo Hettwer et al. (1995), a liberação de glicose e a formação de levana, catalisada pela enzima levanasacarase purificada, produzida por *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, ocorreram em meio reacional contendo até 10% de solução de sacarose, enquanto em concentrações superiores ocorreu, preferencialmente, a hidrólise da sacarose. Entretanto, Jang et al. (2001) e Song et al. (1993) concluíram que a concentração de 20% de sacarose é ótima para a atividade da enzima levanasacarase imobilizada e livre, respectivamente, ambas produzidas por *Zymomonas mobilis* e expressa em *Escherichia coli*.

Segundo relatos de alguns autores, diferentes íons metálicos e agentes quelantes afetam diretamente as atividades da enzima levanasacarase.

Vigants et al. (1998) perceberam uma ativação direta da levanasacarase *in vitro* quando adicionado ao meio reacional os sais NaCl e KCl. Já Kang et al. (2005) observaram que HgCl₂ e AgNO₃ diminuíram as atividades da enzima levanasacarase M1FT em 92% e 86%, respectivamente, quando foi pré-incubada com esses íons metálicos durante 30 minutos a 30°C, e também que a mesma foi ligeiramente inibida por FeSO₄, EDTA e SDS. Segundo Hernandez et al. (1995), a enzima levanasacarase de *A. diazotrophicus* também foi ligeiramente inativada por FeSO₄.

A enzima fructosiltransferase (FTF) de *Lactobacillus reuteri* linhagem 121 foi completamente inibida por íons Cu^{2+} e Fe^{3+} , enquanto os íons cálcio foram requeridos para sua atividade (VAN HIJUM et al., 2001). Foram observados grandes efeitos inibitórios de Cu^{2+} e Fe^{3+} para as enzimas FTF de *S. salivarius* (SONG e JACQUES, 1999) e de *Bacillus subtilis* (CHAMBERT et al., 1974), entretanto os mecanismos precisos pelos quais os íons de metais pesados inibem enzimas FTF ainda não estão esclarecidos. Jacques (1984) relatou que os íons Ca^{2+} podem estabilizar enzimas FTF, como observado em *S. salivarius*.

Ammar et al. (2002) observaram que o Fe^{2+} aumentou em 4 vezes a atividade da enzima levanasacarase de *Bacillus* sp. TH4-2 quando comparada ao controle e adição de Na^+ , enquanto todos os outros íons metálicos testados diminuíram sua atividade, especialmente Zn^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} . Segundo Yanase et al. (1992), a enzima levanasacarase de *Z. mobilis* Z6C também foi inibida por vários metais tais como Ag^{2+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} , mas nenhuma inibição foi observada na presença de EDTA. Ohtsuka et al. (1992) também relataram que Hg^{2+} e Ag^+ são inibidores potenciais da enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM 1683.

Quando a enzima levanasacarase purificada, produzida por *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*, foi incubada por 6 horas a temperatura ambiente com agentes fortemente desnaturantes, tais como uréia (6M), deoxicolato (1%) e SDS (10%), houve um ligeiro decréscimo em sua atividade, ou seja, para 60%, 96% e 73%, respectivamente. Entretanto, a atividade aumentou para 120 e 112% na presença dos detergentes Tween 20 (1%) e Elugent (1%), respectivamente. A presença, no meio reacional, dos íons Fe^{3+} , Fe^{2+} e Ca^{2+} não surtiram efeito na atividade da enzima levanasacarase, enquanto Al^{3+} e Cu^{2+} produziram 88 e 82% de inibição, respectivamente (HETTWER; GROSS; RUDOLPH, 1995).

Dentre os íons e detergentes testados, na atividade da enzima levanasacarase produzida por *Zymomonas mobilis* e expressa em *Escherichia coli*, o íon Hg^{2+} causou completa inibição tanto da enzima imobilizada em superfície de magnetita quanto livre, enquanto Triton X-100, CaCl_2 e ZnCl_2 aumentaram as atividades da enzima (JANG et al., 2001).

Sangiliyandi et al. (1999) determinaram que a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por *E. coli* recombinante foi altamente inibida quando em presença de CuSO_4 (95%) e em HgCl_2 (100%), e moderadamente inibida quando em presença de ZnSO_4 (50%) e AlCl_3 (22%). Alguns íons, tais como MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl , KCl e CoCl_2 surtiram menor efeito sobre a atividade da enzima (< 15%). Visto que EDTA não surtiu efeito algum sobre a atividade da enzima, pode-se, portanto perceber que não é necessária a presença de um íon metal cofator para a atividade levanasacarase.

Tanaka et al. (1979) investigaram as condições de produção de levana e estabeleceram que a levana de baixo peso molecular quando adicionada ao meio de reação atua como ativador da enzima levanasacarase mais do que a de alto peso molecular, e que este efeito diminui com o aumento da força iônica do meio de reação. Tanaka et al. (1980) também relataram que a síntese de levana de alto peso molecular, catalisada pela enzima levanasacarase de *Bacillus subtilis*, ocorreu na presença de álcoois no meio reacional.

Segundo Hettwer et al. (1995), a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase de *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* foi observada somente quando havia no meio reacional sacarose como substrato e não rafinose ou decilsacarose. Entretanto, Andersone et al. (2004) relataram que a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* 113 S pode realizar a polimerização de moléculas de frutose provindas da quebra de rafinose, com conseqüente formação de levana e liberação de moléculas de melibiose não-catabolizadas dentro do meio. Sangiliyandi et al. (1999) determinaram que a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por *E.coli* recombinante exibiu as mesmas atividades de hidrólise de sacarose e de formação de levana em sacarose e rafinose, não possuindo atividade em maltose. Tkachenko e Sevryugina (1989) também relataram que a atividade de síntese de levana, da linhagem isolada de *Bacillus polymyxa*, é encontrada em meios de fermentação contendo sacarose ou rafinose como fontes de carbono.

3.3.5 - Síntese de Levana

Ammar et al. (2002) quantificaram a levana produzida pela enzima levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp. TH4-2, em diferentes temperaturas, tempos de incubação e concentrações de sacarose. Verificaram que a máxima produção de levana (200mg/mL) ocorreu a 50°C, em solução de sacarose 36%, após de 24 horas de incubação. Já a síntese de levana, pela enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM-1683, foi mais alta a 40°C, sendo que na temperatura ótima para atividade da enzima (50°C) a reação de hidrólise da sacarose foi preferencial em relação à síntese de levana (OHTSUKA et al. 1992).

Tanaka et al. (1978) relataram que a síntese de levana por levanasacarase de *Bacillus subtilis* ocorre mais efetivamente a baixas temperaturas do que em temperaturas

ambiente ou mais elevadas, ao contrário da atividade aparente da enzima, determinada pela glicose liberada, que foi menor em baixas temperaturas.

3.3.6 - Determinação dos Valores de K_M e V_{Max}

O valor de K_M da levanasacarase de *A. diazotrophicus* é de 11,8mM (HERNANDEZ et al. 1995). Entretanto, as enzimas levanasacarases de *Zymomonas mobilis* (YANASE et al., 1992), *P. syringae* (HETTWER; GROSS; RUDOLPH, 1995) e *R. aquatilis* JCM-1683 (OHTSUKA et al., 1992), possuem valores de K_M mais elevados, 160, 122 e 50 mM, respectivamente, em meio contendo sacarose.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MICRORGANISMO

Para a produção do extrato enzimático, foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, obtida na Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

4.2 - MEIOS DE CULTURA

4.2.1 - Meio de Manutenção da Cultura

A linhagem bacteriana foi cultivada e mantida em um meio contendo: caldo de cana clarificado (100,0mL); água destilada (30,0mL); CaCO_3 (0,4g); extrato de levedura (0,4g) e agar nutriente (1,5g). Após a inoculação, as células foram incubadas por 24 horas a 30°C, e então os tubos foram mantidos em geladeira a 4°C e a cultura reativada a cada 3 meses.

4.2.2 - Meio para Pré-Fermentação

O meio de pré-fermentação foi composto por: 5,0g/L extrato de levedura; 1,0g/L KH_2PO_4 ; 1,0g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A solução de sacarose (2,0%) utilizada foi esterilizada separadamente da solução de sais, a 121°C por 20 minutos e ambas misturadas assepticamente para a preparação do meio de pré-fermentação.

4.2.3 - Meio de Fermentação

O meio de fermentação foi composto por: 5,0g/L extrato de levedura; 1,0g/L KH_2PO_4 ; 1,0g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, segundo Rodriguez e Callieri (1986). Foi utilizada uma solução de sacarose (20,0 %), esterilizada separadamente da solução de sais, a 121°C por 20 minutos e misturadas assepticamente para a produção do meio de fermentação.

4.3 – CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 - Preparo do Pré-Inóculo

A partir da cepa de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, armazenada em geladeira (cultura estoque), foram inoculados por esgotamento tubos de ensaio inclinados contendo o meio de manutenção descrito no item 4.2.1. e incubados a 30°C por 24 horas.

4.3.2 - Pré - Fermentação

Após a incubação, como descrito em 4.3.1, foi feita a suspensão da cultura de células bacterianas pela adição de 5,0mL de água destilada estéril e transferida para frascos Erlenmeyer de 250,0mL contendo 30,0mL do meio sintético, proposto por Rodriguez e Callieri (1986), adicionado de 20,0mL de uma solução de sacarose (Sigma-EUA) na concentração de 2,0% e o pH do meio ajustado para 7,0. Os frascos foram incubados em “Shaker” rotatório Marconi, modelo MA 830, a 30°C a uma agitação de 200 rotações por minuto (rpm) durante 24 horas.

4.3.3 – Fermentação

4.3.3.1 - Padronização do Inóculo

Em uma cubeta de espectrofotômetro, foram adicionados 3,0mL da solução de sais e gotas do caldo de cultura obtido no item 4.3.2, até que a leitura de absorbância atingisse o valor de 0,3 no comprimento de onda de 570nm. Através de uma regra de três, foi verificado o volume do inóculo a ser adicionado em cada frasco Erlenmeyer que continha 50,0mL do meio de fermentação, de acordo com FARIA (2002). Separadamente foi realizada a centrifugação de 10,0mL do caldo fermentado, feita a diluição das células com água destilada e posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro a 570nm. Através de uma correlação com a curva de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 feita previamente, pode-se calcular a concentração (mg de peso seco/mL) do inóculo adicionado em cada frasco de fermentação.

O espectrofotômetro utilizado para as determinações fotométricas foi o modelo Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”.

4.3.3.1.1 - Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494

Para a construção da curva de calibração da concentração celular, foi utilizada a suspensão de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 obtida após o processo de pré-fermentação.

A construção da reta de calibração foi executada da seguinte forma:

- Um volume de 50,0mL de cultura de células de *Zymomonas mobilis*, obtido nas condições de pré-fermentação, foi centrifugado a 694g a 4°C, durante 15 minutos, e lavado duas vezes com água destilada;
- A massa celular úmida foi, então, ressuspensa em 50,0mL de água destilada (suspensão original) e posteriormente foram preparadas diferentes diluições;

- Um volume de 5,0mL da suspensão celular original e de cada diluição de suspensão de células foi colocado em cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 90°C, e pesados em balança analítica;
- Os cadinhos, contendo a suspensão celular original e as diferentes diluições, foram levados em estufa a 90°C, por 24 horas;
- Os cadinhos foram transferidos para um dessecador, contendo cristais de sílica, e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento;
- Os cadinhos foram pesados em balança analítica, transferidos novamente para o dessecador e, após 30 minutos, novamente pesados, a fim de confirmar a constância das medições. A operação foi repetida cerca de 2 horas depois;
- Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos vazios e do peso dos cadinhos com células, foi determinada a concentração celular da suspensão celular original e a das amostras que foram diluídas;
- Paralelamente, foram feitas leituras de absorbância a 570 nm com a amostra da suspensão celular original e com as diluídas em espectrofotômetro modelo Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”.
- Com base nas absorbâncias das amostras diluídas e da suspensão original, foi construída a reta de calibração, relacionando a absorbância com a concentração celular (Tabela 4 e Gráfico 1, em anexo).

4.3.3.2 – Fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 250,0mL contendo 50,0mL de meio de fermentação com diferentes valores de pH iniciais (5,0, 6,0 e 7,0) e incubados em “Shaker” rotatório Marconi, modelo MA 830, a 30°C e a uma agitação de 200rpm. Para cada frasco de fermentação foi feito um frasco controle. No decorrer da fermentação, em intervalos de tempos definidos (6, 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas), os frascos foram retirados e então colhidas amostras para determinação de açúcares redutores, açúcares totais, pH, biomassa celular, levana, atividade de hidrólise de sacarose do extrato enzimático bruto e atividade de formação de levana da enzima levanasacarase.

4.4 – MÉTODOS

4.4.1 – Processo Fermentativo

Durante todo o processo fermentativo foram retiradas amostras para a determinação do pH, da concentração celular, do biopolímero levana, de açúcares totais (AT), açúcares redutores (AR), atividade de hidrólise de sacarose e atividade da enzima levanasacarase.

O tratamento analítico das amostras retiradas foi realizado de acordo com o esquema da Figura 3:

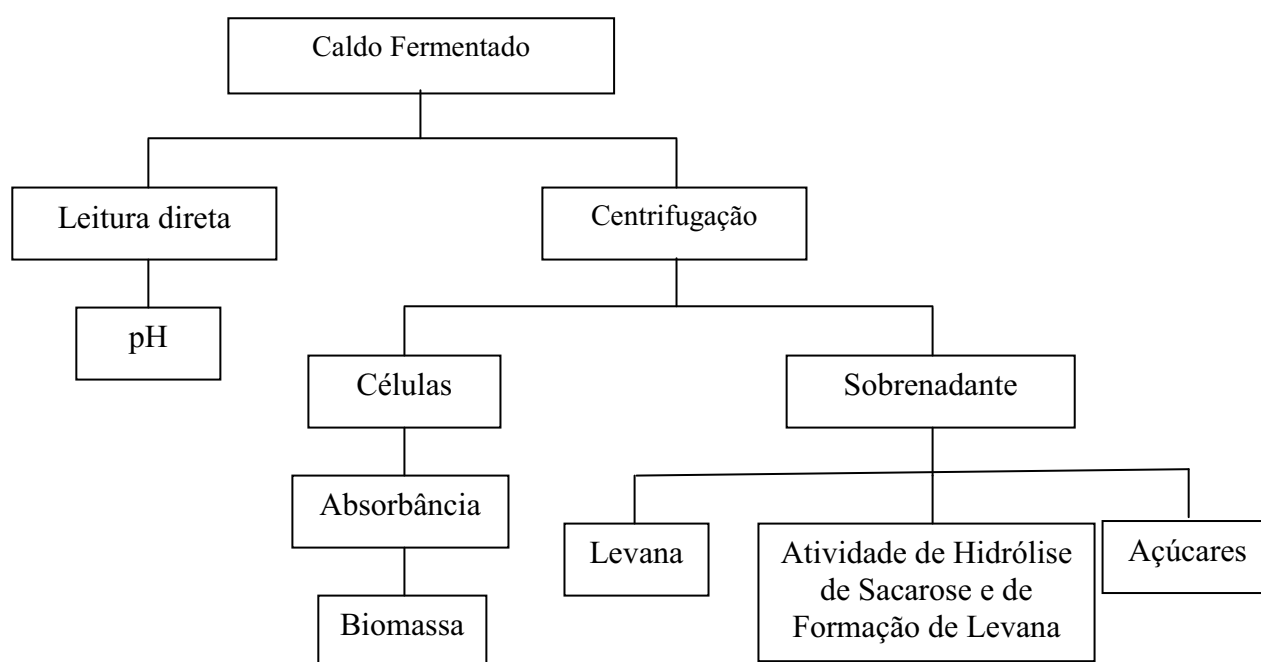


Figura 3 - Esquema do tratamento analítico das amostras obtidas após processo fermentativo, a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

4.4.1.1 - Coleta e Preparo das amostras

As amostras de cada ensaio foram colhidas a aproximadamente 20°C. Primeiramente, foi determinado o valor do pH final do caldo de fermentação e, em seguida, 10,0mL desse caldo foram centrifugados a 6941g, 4°C, durante 15 minutos, para a medição da concentração celular no espectrofotômetro. O restante do caldo obtido da fermentação foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante foi separado. Parte dele foi utilizado imediatamente para as determinações da atividade de hidrólise de sacarose e da atividade da enzima levanasacarase, e a outra parte congelada para as análises posteriores (determinação de levana, de açúcares totais, açúcares redutores).

4.4.1.2 - Determinação do pH

O pH foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria com um pHmetro Digimed modelo DM20.

4.4.1.3 - Estimativa da Biomassa

Após a centrifugação do caldo fermentado, a concentração celular foi determinada pela medição da absorbância de suspensões diluídas em água destilada, a 570nm, para sua conversão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume), através de uma correlação com a curva de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 descrita previamente no item 4.3.3.1.1.

4.4.1.4 - Determinação de Levana

O polissacarídeo foi quantificado no sobrenadante das amostras de fermentação após centrifugação a 6941g, 4°C e durante 15 minutos. Para a precipitação da levana formada, retirou-se 2,0mL do sobrenadante obtido após a centrifugação e adicionou-se 6,0mL de etanol anidro, previamente resfriado. A solução foi homogeneizada e deixada em repouso por 24 horas em câmara fria a 4°C. O material obtido foi centrifugado a 3123 g, 0°C por 20 minutos. A precipitação pelo etanol foi repetida novamente para aumentar o grau de pureza do material isolado e foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições. A levana precipitada foi hidrolisada à frutose com 7,0mL de HCl 0,5% a 96°C por 60 minutos. O material hidrolisado foi neutralizado com 0,7mL de NaOH 2,0 M. A levana foi estimada indiretamente, como unidades de frutose (mg/mL), pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Todas as análises foram realizadas em triplicata. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” a 540 nm e correlacionadas a uma curva padrão de frutose feita previamente (Tabela 5 e Gráfico 2, em anexo).

4.4.1.5 - Determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944) e os açúcares totais (AT), pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956).

Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda desejado para cada método utilizado, tendo como base amostras de açúcares com concentrações conhecidas e, posteriormente, construiu-se uma curva de calibração utilizando o método Somogyi e Nelson (Tabela 5 e Gráfico 2, em anexo) e Dubois (Tabela 6 e Gráfico 3, em anexo).

4.4.1.6 - Atividade Enzimática de Hidrólise de Sacarose

As amostras dos sobrenadantes, obtidas conforme o item 4.4.1.1, foram utilizadas como fonte de enzima extracelular.

A atividade de hidrólise da sacarose foi realizada com uma mistura reacional composta por extrato enzimático bruto (100 μ L) e 900 μ L de sacarose 10,0% em tampão acetato de sódio 0,05M e pH 5,0 a 30°C por 30 minutos. Foram feitos brancos de reação. A reação enzimática foi interrompida por fervura em água durante 10 minutos. A determinação quantitativa dos açúcares redutores foi feita de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944). (Tabela 7 e Gráfico 4, em anexo).

Uma unidade de atividade de sacarase foi definida como a quantidade de enzima que produz açúcares redutores equivalentes a 1 μ mol de glicose por minuto sob condições padrão (SANGILIYANDI E GUNASEKARAN, 2001).

4.4.1.7 - Atividade Enzimática Aparente de Formação de Levana

Para a determinação da atividade de formação de levana, as amostras dos sobrenadantes obtidas conforme o item 4.4.1.1 foram utilizadas como fonte da enzima extracelular. A determinação da atividade aparente da enzima levanasacarase foi realizada adotando-se a técnica de Wendt (2001), com algumas modificações. Uma mistura reacional composta por 100 μ L do extrato enzimático bruto e 400 μ L de sacarose 10,0% em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 5,5, reagiu a 30°C por 3 horas. Para cada tubo teste foi feito um branco de reação. A reação enzimática foi interrompida por fervura em água durante 10 minutos para desnaturação da enzima. A concentração de glicose foi determinada através do método da glicose oxidase/peroxidase (Kit Bio Diagnóstica – Glicose Enz Color). As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” a 500nm e correlacionadas a uma curva padrão de glicose feita previamente (Tabela 8 e Gráfico 5, em anexo).

Uma unidade de atividade da enzima levanasacarase (atividade de transfrutossilação) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de glicose/minuto/mL.

4.4.1.8 - Cálculos dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados de acordo com as equações descritas abaixo:

4.4.1.8.1 - Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \times 100 \quad (\%) \quad (\text{equação 1})$$

4.4.1.8.2 - Coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)} \times 100 \quad (\%) \quad (\text{equação 2})$$

4.4.1.8.3 – Produtividade

$$P = \frac{(P_f - P_0)}{(t_f - t_0)} \quad (\text{g/L.h}) \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

X_0 = massa celular seca (g/L)

X_f = massa celular seca final (g/L)

S_0 = concentração inicial de substrato (g/L)

S_f = concentração final de substrato (g/L)

P_0 = massa produto inicial (g/L)

P_f = massa de produto final (g/L)

t_0 = tempo inicial (h)

t_f = tempo (h)

$Y_{x/s}$ = coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao substrato consumido

$Y_{p/s}$ = coeficiente de rendimento do produto em relação ao substrato consumido

P = produtividade

4.4.2 - Caracterização do Extrato Enzimático quanto à Atividade de Hidrólise de Sacarose

4.4.2.1 - Determinação do Período de Incubação

Inicialmente foram realizados dois ensaios enzimáticos, para a determinação do melhor período de incubação para a atividade de hidrólise de sacarose do extrato enzimático, seguindo o procedimento do item 4.4.1.6. Para tal utilizaram-se duas diferentes concentrações de extrato enzimático bruto (0,1ml e 0,2ml, respectivamente), alterando-se o tempo de reação da enzima com o substrato. Os períodos de reação foram de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 30°C. Após determinar que o melhor tempo de reação foi de 10 minutos, para o cálculo da velocidade inicial da reação, 0,1ml de extrato enzimático bruto foi reagido com sacarose 10% em tampão acetato de sódio 50mM e pH 5,0 de 0 a 10 minutos, sendo retiradas amostras minuto a minuto para quantificação dos açúcares redutores formados. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” a 540nm e correlacionadas a uma curva padrão de frutose feita previamente.

4.4.2.2 - Determinação do pH Ótimo

Para a determinação do pH ótimo do extrato enzimático bruto, foram testados diferentes valores de pH, na presença de solução de sacarose 10 %. Os valores de pH testados variaram de 3,5 até 7. Os tampões utilizados foram: ácido fórmico (pH 3,5), acetato de sódio (pH 4, 4,5, 5,0 e 5,5) e MES (pH 6,0, 6,5 e 7,0), todos com concentração de 50mM. A mistura reacional composta por 100μL de extrato enzimático e 900μL de solução de sacarose 10,0% em diferentes valores de pH foi ensaiada por 10 minutos a 30°C, com os respectivos brancos de

reação. A reação foi finalizada por desnaturação da enzima em banho-maria a ebulição por 10 minutos e determinada a quantidade de açúcares redutores formados de acordo com o método de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

4.4.2.3 - Determinação da Temperatura Ótima

A mistura reacional utilizada para determinar a temperatura ótima do extrato bruto enzimático foi composta por sacarose 10,0% (900µL) em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0 e extrato enzimático bruto (100µL). Foram feitos brancos de reação (100µL de extrato enzimático e 900µL de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0). Os tubos testes e os brancos de reação foram ensaiados a diferentes temperaturas 20, 25, 30, 35, 40, 45°C, durante 10 minutos. A reação foi finalizada por desnaturação da enzima em banho-maria em ebulição e determinada a quantidade de açúcares redutores formados de acordo com Somogyi (1945) e Nelson (1944).

4.4.2.4 – Efeito da Concentração de Sacarose

Para estudar o efeito da sacarose na atividade de hidrólise do extrato enzimático, o sistema de reação foi constituído de 100µL de extrato enzimático bruto e 900µL de solução de sacarose em diferentes concentrações 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5% dissolvida em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0 a 40°C por 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida por fervura em água durante 10 minutos e realizada a determinação da quantidade de açúcares redutores formados de acordo com Somogyi (1945) e Nelson (1944).

4.4.2.5 - Determinação da Estabilidade ao pH

A fim de verificar a estabilidade do extrato enzimático em diferentes valores de pH (4,0 a 7,0), a mistura reacional constituída de 1,0mL do sobrenadante e 1,0mL dos respectivos tampões 50mM foi mantida por 24 horas a temperatura ambiente. Uma alíquota foi

retirada para determinar a atividade de hidrólise de sacarose residual do extrato enzimático bruto sob condições ótimas.

4.4.2.6 - Determinação da Estabilidade Térmica

Para verificação da estabilidade térmica, 1,0mL do sobrenadante foi mantido em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40 e 45°C) em pH 4,0 por 30 minutos. Uma alíquota foi retirada para determinar a atividade de hidrólise de sacarose residual do extrato enzimático bruto sob condições ótimas.

4.4.3 - Caracterização da Levanasacarase quanto à Atividade de Formação de Levana

4.4.3.1 - Testes preliminares realizados para a produção de levana

Foram realizados diferentes ensaios (Tabela 9) para verificar a inibição do crescimento de células bacterianas durante a produção de levana, utilizando a enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto. Este foi produzido pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 durante 12 horas de fermentação, em meio com pH inicial de 7,0, 200g/L de sacarose e adição de sais, temperatura de incubação de 30°C e agitação de 200rpm. O biopolímero levana foi quantificado de acordo com o item 4.4.1.4.

Para a obtenção de solução de sacarose estéril, a mesma foi filtrada em membrana filtrante de 0,22µm de poro. O antibiótico Cloranfenicol foi adicionado aos meios de reação (Ensaio 1, 2, 3 e 4) até a obtenção da concentração de 10µg/mL, de acordo com Tkachenko e Sevryugina (1989).

Tabela 9 - Ensaios enzimáticos para a produção de levana utilizando o extrato enzimático bruto e sacarose 20% sob diferentes condições de reação.

Composição dos meios reacionais	Composição dos frascos controle	Tempos e Temperatura de reação
1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 4,0 e adição de cloranfenicol.	1.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 4,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 30°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas
2) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 4,0 e adição de cloranfenicol.	2.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 4,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 30°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas
3) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e adição de cloranfenicol.	3.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 30°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas
4) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e adição de cloranfenicol.	4.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 30°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas
5) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 4,0 e sem adição de cloranfenicol.	5.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 4°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas
6) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e sem adição de cloranfenicol.	6.1) 30ml de extrato enzimático bruto + 20ml de sacarose 20% não esteril em tampão acetato de sódio pH 5,0 e sem adição de cloranfenicol.	T = 4°C, Tempos = 24, 48 e 72 horas.

4.4.3.1.1 – Coloração de Gram

A coloração de Gram foi realizada para verificar a ausência de crescimento celular nos diferentes extratos enzimáticos.

4.4.3.2 - Caracterização da levanasacarase do extrato bruto ajustando os parâmetros envolvidos pela metodologia de superfície de resposta

Para a determinação da atividade de formação de levana foi utilizado o planejamento estatístico do programa Statistic 7.0 (StatSoft), usando um delineamento do tipo 3^{4-0} , com um total de 81 experimentos, sendo que cada um deles foi realizado em triplicata.

As variáveis estudadas foram: X_1 = Concentração de Sacarose (g/L), X_2 = Temperatura de Reação (°C), X_3 = Tempo de Reação e X_4 = pH do meio reacional. A resposta analisada foi atividade de formação de levana (Y_1), da enzima levanasacarase.

Diferentemente do item 4.4.1.7, no qual para a atividade de formação de levana adotou-se a técnica de Wendt (2001), com algumas modificações, para a obtenção destas, amostras da levana produzida foram quantificadas conforme o item 4.4.1.4, sob as diferentes condições testadas. Definiu-se uma unidade de atividade de formação da enzima levanasacarase como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mg de levana /hora /mL.

Também a partir de cada um dos 81 experimentos, realizados em triplicata, foram determinados os açúcares totais (AT) e açúcares redutores formados, para uma melhor discussão dos resultados.

A Tabela 10 apresenta as variáveis independentes, codificadas, estudadas para a determinação dos melhores parâmetros para a atividade de formação de levana, a partir do extrato enzimático produzido por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Tabela 10 - Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a determinação dos melhores parâmetros para a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase (Y_1) de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1 – Sacarose (g/L)	10	25	40
X_2 – T (°C)	20	30	40
X_3 – Tempo (horas)	24	48	72
X_4 – pH	4	5	6

4.4.3.3 – Estabilidade ao Congelamento

Foi verificada a atividade enzimática da levanasacarase no extrato enzimático bruto submetido ao congelamento durante 3 meses. Para isso foi determinada a atividade enzimática de formação de levana a cada 15 dias. Para a determinação da atividade enzimática, utilizou-se a metodologia e os melhores parâmetros determinados no item 4.4.3.2.

4.4.3.4 – Efeito de íons metais

Foi verificado o efeito da adição dos íons metálicos (CaCl_2 , KCl e MgSO_4) na atividade da enzima levanasacarase. A atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia e os melhores parâmetros determinados no item 4.4.3.2, com a adição de soluções 5mM de cada íon.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Efeito do pH Inicial do Meio de Fermentação na Produção de Levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Diversos parâmetros de fermentação são reguladores da biossíntese de levana pelos microrganismos produtores. Entre estes, a temperatura e o pH (DOELLE et al., 1993; YOO et al., 2004), a concentração do meio e o tempo de cultivo (MURO et al., 2000; YOO et al., 2004) e a osmolalidade do meio de crescimento garantida pelo alto teor de sacarose (BEKERS et al., 2000).

Nesta pesquisa para as determinações dos melhores parâmetros para produção de levana, foram realizadas diferentes fermentações submersas, em diferentes valores de pH inicial (5,0, 6,0 e 7,0), utilizando o microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494. A temperatura de fermentação foi de 30°C, a concentração de sacarose 200g/L e a velocidade de agitação 200rpm. Estes parâmetros foram fixados em todos os ensaios e foi seguida a metodologia utilizada por Ernandes (2006). O inóculo adicionado inicialmente em cada frasco de fermentação foi de 0,052mg de peso seco/mL.

Nos Gráficos 6 e 7 são mostrados os resultados obtidos a partir da quantificação dos açúcares totais e dos açúcares redutores durante diferentes tempos de fermentação sob as três diferentes condições de fermentação citadas anteriormente .

No Gráfico 6 ocorrem diminuições dos açúcares totais ao longo das três diferentes condições de fermentação testadas até 48 horas, permanecendo praticamente constante até as 96 horas de fermentação. Observa-se também que nos meios com pH inicial de 6,0 e 7,0 o consumo destes açúcares é mais acentuado quando comparado ao meio com pH inicial de 5,0.

Ao observar o Gráfico 7, pode-se notar que as três curvas de açúcares redutores são semelhantes e que as maiores quantidades de açúcares redutores foram quantificadas nas amostras retiradas em 6 horas de fermentação, nas três diferentes condições, ou seja, 70,00mg/ml, 60,00mg/ml e 60,00mg/ml nos meios com pH inicial de 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente.

Os resultados de produção do biopolímero levana obtidos nos diferentes valores de pH iniciais estão representados no Gráfico 8, durante todo o período de fermentação utilizando *Zymomonas mobilis*.

A produção de levana (Gráfico 8) foi pequena quando comparada a de açúcares redutores (Gráfico 7). Isto ocorreu, porque a bactéria *Zymomonas mobilis* hidrolisa a sacarose e utiliza os açúcares redutores para seu crescimento, para a produção de levana e também para a formação de outros subprodutos tais como frutooligômeros e sorbitol (SANGILYANDI; RAJ; GUNASEKARAN, 1999). Essa distribuição da fonte de carbono para o crescimento celular e formação de frutanas também foi observado por Dawes e Ribbons (1966), os quais acompanharam a formação de levana durante o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* N.C.I.B. 8938.

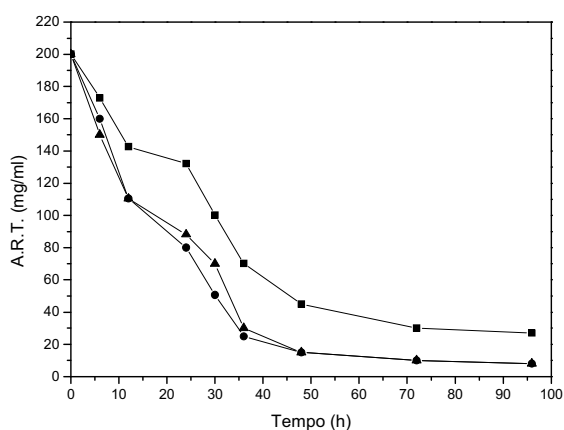


Gráfico 6 - Quantificação dos açúcares totais (mg/mL) nos meios com diferentes valores de pH inicial, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm, incubação a 30°C, durante 96 horas de fermentação. (pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

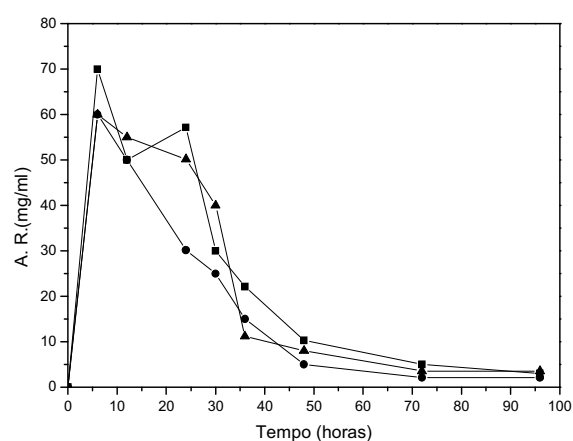


Gráfico 7 - Quantificação dos açúcares redutores (mg/mL) nos meios com diferentes valores de pH inicial, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm, incubação a 30°C, durante 96 horas de fermentação. (pH 5,0 (■), pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

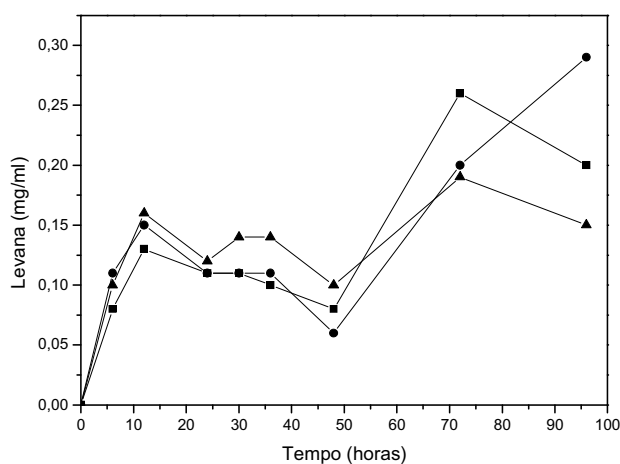


Gráfico 8 – Efeito da variação do pH inicial no meio contendo 200 g/L de sacarose na produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em diferentes tempos de fermentação incubados a 30°C e 200rpm (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

No Gráfico 8, observa-se que, para as três diferentes condições de fermentação, houve um aumento da concentração do biopolímero nos meios de cultura nas primeiras 12 horas de fermentação. Isso provavelmente ocorreu porque há bastante substrato nos meios de cultivo (Gráficos 6 e 7), as bactérias encontram-se em fase de crescimento exponencial (Gráficos 12, 13 e 14) e as atividades das enzimas levanasacarases produzidas são intensas (Gráfico 25). Em vista disso, as células da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 produzem o biopolímero levana como forma de precaução, sendo, assim, uma fonte de reserva.

Após esse tempo houve um decréscimo em 24 e 48 horas (Gráfico 8), visto que o substrato nos meios de cultivo também vão se tornando mais escassos (Gráficos 6 e 7). Novos aumentos da produção do biopolímero foram quantificados em 72 horas. Esse comportamento é típico das células bacterianas produtoras de biopolímero, pois ao se sentirem ameaçadas, ou seja, quando não há praticamente substrato nos meios de cultivo (Gráficos 6 e 7), produzem esse produto como forma de proteção das próprias células. E no final da fermentação, nos meios com pH iniciais de 5,0 e 7,0, houve decréscimo da produção de levana, o mesmo não foi observado no meio de fermentação com pH inicial de 6,0. Neste último foi constatada a maior produção do biopolímero nas 96 horas de fermentação (290µg/ml) com o pH final do meio de 4,0 (Gráfico 13). Esse comportamento pode estar relacionado com o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* nas três diferentes condições de fermentação (Gráficos 12, 13 e 14), pois em

meios com pH inicial de 5,0 e 7,0 as células bacterianas estão em fase de declínio, enquanto em meio com pH inicial de 6,0, encontram-se na fase estacionária.

Parte deste comportamento também foi verificado por Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) ao testar o efeito do pH na produção de levana por *Zymomonas mobilis* B4286 durante 24 horas de fermentação. Os autores observaram que, para as diferentes condições de fermentação testadas, houveram aumentos na produção de levana até 16 horas de fermentação ocorrendo, posteriormente, a diminuição do biopolímero em 24 horas. Isso ocorreu porque as células bacterianas estavam em fase de crescimento exponencial até as 16 horas, entrando na fase de declínio após esse tempo.

Pode-se observar neste experimento que o pH do meio de fermentação teve uma forte influência na produção de levana, o que está de acordo com Lyness e Doelle (1980; 1983). O melhor pH inicial encontrado (pH 6,0) nos experimentos realizados para o meio de cultivo está de acordo com Silva (1996), mas não com Doelle e Greenfield (1985), pois esses autores obtiveram as maiores produções em levana, trabalhando em pH inicial de 5,0 e numa temperatura de 27 a 30°C.

Ao compararmos os resultados obtidos da melhor condição para a produção de levana com de outros autores que utilizaram diferentes cepas de microrganismos (YOSHIDA et al., 1990; ANANTHALAKSHMY e GUNASEKARAN, 1999), foi observado que essas condições diferiram entre si. Entretanto, Doelle et al. (1989) provaram que são necessárias diferentes condições para a produção de levana quando utilizadas diferentes cepas de microrganismos.

Nos Gráficos 9, 10 e 11, podem-se observar os resultados de $Y_{X/S}$ (%), $Y_{P/S}$ (%) e P (mg/ml.h) obtidos ao longo das 96 horas de fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em meios com diferentes valores de pH iniciais.

Pelo Gráfico 9 pode-se observar o maior valor de coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) em meio com pH inicial de 7,0 e 30 horas de fermentação comprovado pela maior concentração de biomassa encontrada nesse mesmo ponto (Gráfico 14). Nos meios com pH inicial de 5,0 e 6,0, os maiores valores encontrados foram em 24 horas de fermentação.

Os maiores rendimentos do produto ($Y_{P/S}$) foram obtidos em 6,0 horas de fermentação nos meios com pH inicial de 5,0 e 6,0 (Gráfico 10). Isso ocorreu visto que houve um consumo menor de açúcares totais (AT) quando o microrganismo cresceu nos meios com pH inicial de 5,0 e 6,0 em relação ao de 7,0 (Gráfico 6).

No Gráfico 11 podem-se observar os maiores picos de produtividade, para as três diferentes condições de fermentação em 6 horas de incubação. Logo após, houve decréscimos da produtividade até o final da fermentação, mantendo-se praticamente constante. As produtividades encontradas em 6 horas de fermentação nos meios com pH inicial de 6,0 e 7,0 foram praticamente as mesmas (0,018mg/ml.h e 0,017mg/ml.h, respectivamente) tendo uma ligeira diferença em relação ao meio com pH inicial de 5,0 (0,013 mg/ml.h).

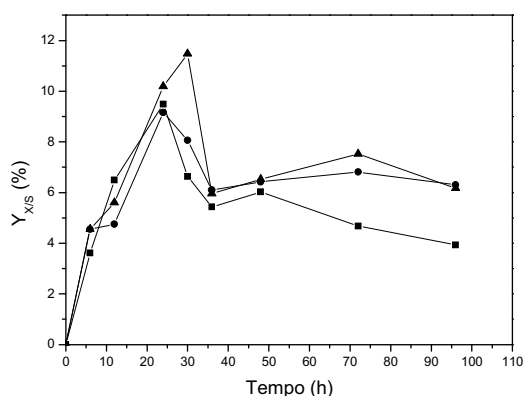


Gráfico 9 – Determinação do Rendimento Celular ($Y_{X/S}$) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200 rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

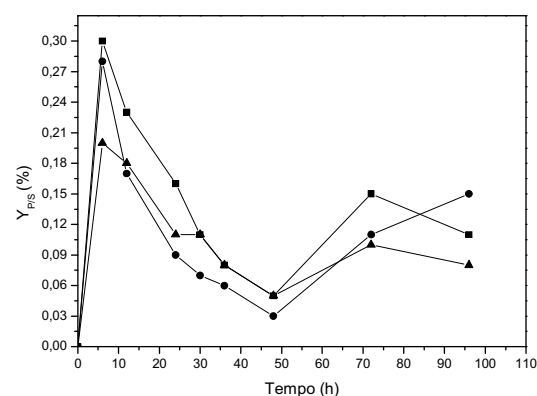


Gráfico 10 – Determinação do Rendimento do Produto ($Y_{P/S}$) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200 rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

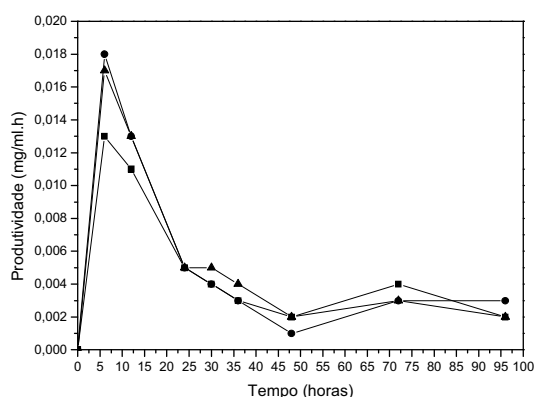


Gráfico 11 – Determinação da Produtividade (P) em diferentes tempos de fermentação, em meio com sacarose 20%, diferentes valores de pH inicial, agitação a 200 rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

5.2 - Produção de Levanasacarase e Sacarase Extracelulares com Atividade de Hidrólise de Sacarose em diferentes valores de pH iniciais.

As atividades enzimáticas de hidrólise de sacarose foram determinadas no decorrer da fermentação, em 6, 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas. Os meios de fermentação utilizados eram compostos por sacarose 200g/L adicionados de sais. O pH inicial foi ajustado para 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente e os frascos foram mantidos sob agitação a 200rpm e incubados a 30°C.

Os Gráficos 12, 13 e 14 demonstram a relação entre a atividade de sacarase, o pH final do meio e o crescimento celular em função do tempo de fermentação nos meios com pH iniciais de 5,0, 6,0 e 7,0.

A determinação dos valores de pH final dos meios de fermentação mostram que, independentemente do valor inicial (5,0, 6,0 ou 7,0), houve uma queda do mesmo e após 24 horas de fermentação, manteve-se praticamente constante até as 96 horas (Gráficos 12, 13 e 14).

Isto também foi demonstrado por BEKERS et al. (2005), que também observaram que durante a fermentação em meio de sacarose, *Zymomonas mobilis* 113 “S” não produziu apenas etanol e levana, mas também ácido glicônico, ácido lático e ácido acético, responsáveis pelo abaixamento do pH do meio.

Em relação ao crescimento celular, pode-se observar que no meio com pH inicial de 5,0 (Gráfico 12) as células bacterianas encontram-se na fase de crescimento exponencial até 48 horas de fermentação, havendo morte celular até as 96 horas. Em meio com pH inicial de 6,0 (Gráfico 13) observa-se que há um aumento da biomassa celular até 24 horas, mantendo-se praticamente constante até 96 horas. Podemos observar uma particularidade, para o meio de fermentação com pH inicial de 7,0, visto que há o crescimento celular até 30 horas, um declínio quantificado em 36 horas e um novo aumento até 72 horas e um novo declínio. A maior concentração de biomassa foi encontrada em 30 horas (14,98mg/ml) e meio com pH inicial de 7,0 e o pH final, nesse ponto, foi 3,8 (Gráfico 14).

Os meios com pH 5,0 e 7,0 mostraram picos de atividade de sacarase, o que não ocorreu em pH inicial de 6,0, no qual houve um aumento até 12 horas e manteve-se praticamente constante ao longo do restante da fermentação. Há uma forte relação entre atividade de sacarase e pH final do meio, visualizado nos gráficos 12, 13 e 14.

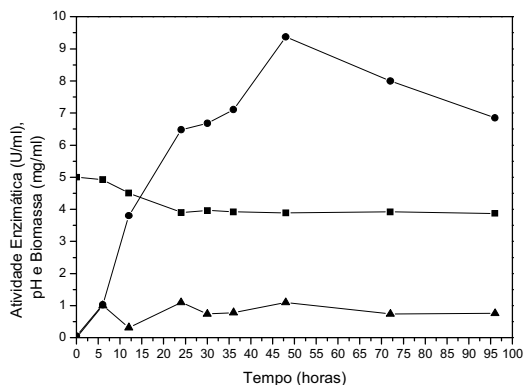


Gráfico 12 - Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 5,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).

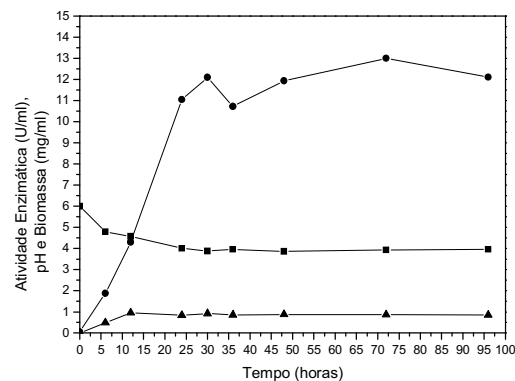


Gráfico 13 - Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 6,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).

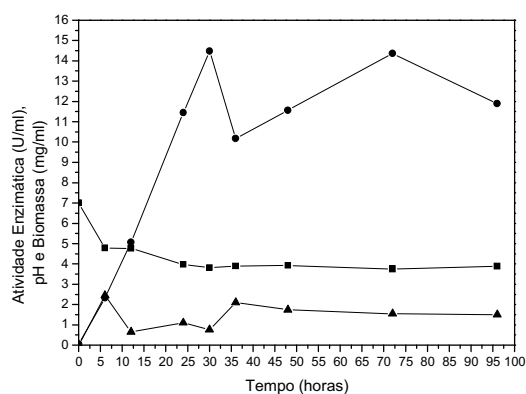


Gráfico 14 - Determinação da atividade de sacarase, pH final do meio e biomassa celular, durante diferentes tempos de fermentação em meio com pH inicial 7,0, 200g/L de sacarose, agitação a 200 rpm e incubação a 30°C (atividade de sacarase (▲), pH final do meio (■) e biomassa celular (mg de peso seco/ml) (●)).

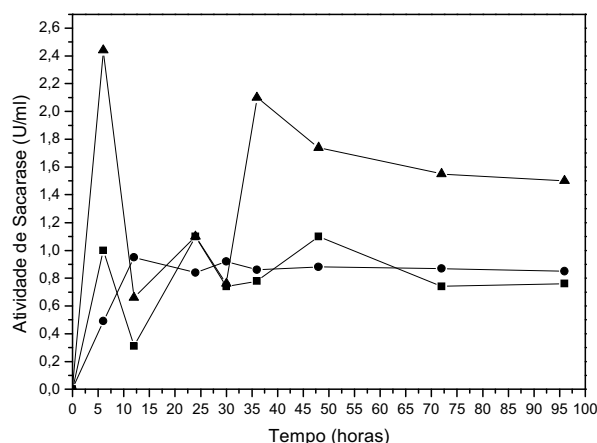


Gráfico 15 – Determinação da atividade de sacarase num meio ajustado a diferentes valores de pH, diferentes tempos de fermentação, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

O Gráfico 15 mostra os resultados das atividades de hidrólise de sacarose (U/mL) em um meio ajustado nos diferentes valores de pH em função do tempo de fermentação (horas).

Como evidenciado no Gráfico 15, o extrato enzimático, produzido durante a fermentação em meio com 200g/L de sacarose, pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, tem sua maior atividade de sacarase em pH inicial de 7,0 após 6 horas de incubação. Observando o Gráfico 14 pode-se perceber que houve uma diminuição do pH de 7,0 para 4,78 após 6 horas de incubação.

O pico de atividade de sacarase encontrado (Gráfico 15) poderia estar relacionado ao pH do meio de fermentação e ser explicado pelo fato do pH 4,78 estar próximo dos valores de pH ótimos relatados anteriormente, para as atividades de hidrólise da enzima sacarase extracelular (pH 5,5) e da enzima levanasacarase produzida pela *E. coli* recombinante (pH 5,0), de acordo com os estudos de YANASE et al. (1995) e de SANGILIYAND et al. (1999). Entretanto, ao comparar os valores de pH finais retirados nas três diferentes condições de fermentação em 6 horas de incubação (Gráficos 12, 13 e 14), podemos observar que os valores encontrados em pH iniciais de 5,0 (4,92) e 6,0 (4,79) são ligeiramente maiores em relação ao encontrado para o pH inicial de 7,0, aproximando - se mais do pH ótimo para atividade de hidrólise das enzimas levanasacarase recombinante e sacarase extracelular. Dessa forma, o pico de atividade de sacarase em meio com pH inicial de 7,0 está relacionado à concentração de

biomassa, pois a mesma é superior sob essa condição de fermentação (Gráficos 14), estando de acordo com Preziosi et al. (1989).

Portanto, para a caracterização do extrato enzimático quanto à atividade de sacarase, o mesmo foi produzido pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 durante 6 horas de fermentação, em meio com pH inicial de 7,0, 200g/L de sacarose, temperatura de incubação de 30°C e agitação de 200rpm.

5.2.1 - Caracterização do Extrato Enzimático quanto à Atividade Sacarase

5.2.1.1 - Determinação do Período de Incubação

No Gráfico 16 está representada a quantidade de produto formado em função do tempo de reação. Os ensaios foram realizados com duas diferentes concentrações do extrato enzimático produzido, 10% de sacarose em tampão acetato de sódio 0,05M e pH 5,0, em diferentes tempos de reação (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) a 30°C.

O Gráfico 16 mostra que a produção de açúcares redutores aumenta linearmente de 0 até os 10 primeiros minutos.

Nos experimentos realizados anteriormente (Gráficos de 12 a 15), para a obtenção das melhores condições de produção do extrato enzimático com atividade de sacarase, foi utilizado o tempo de reação de 30 minutos. Entretanto, após a verificação do melhor tempo de reação, nos experimentos posteriores, foram utilizados 10 minutos, mantendo-se a mesma concentração de extrato enzimático para facilitar a quantificação dos açúcares redutores.

Para o cálculo da velocidade inicial de reação, foi plotado o Gráfico 17. Para a obtenção destes dados, amostras foram retiradas minuto a minuto (0 a 10) e quantificados os açúcares redutores formados.

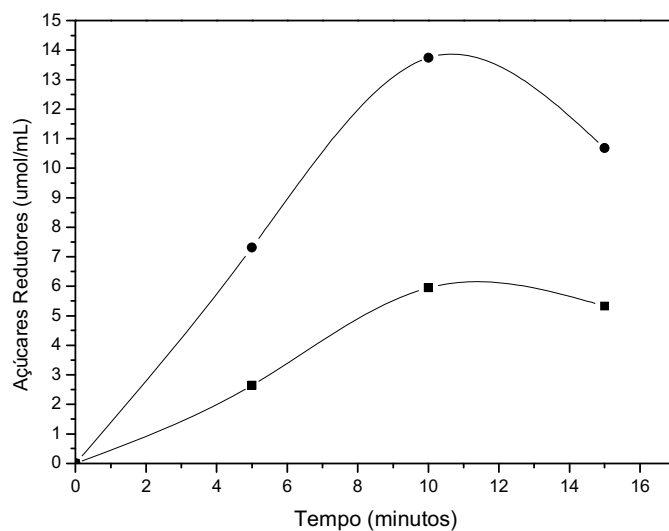


Gráfico 16 - Curvas de progresso de reação para duas concentrações iniciais diferentes de extrato enzimático. (0,1mL de extrato enzimático + 0,9mL de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM e pH 5,0 (■); 0,2mL de extrato enzimático + 0,8 mL de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM e pH 5,0 (●)).

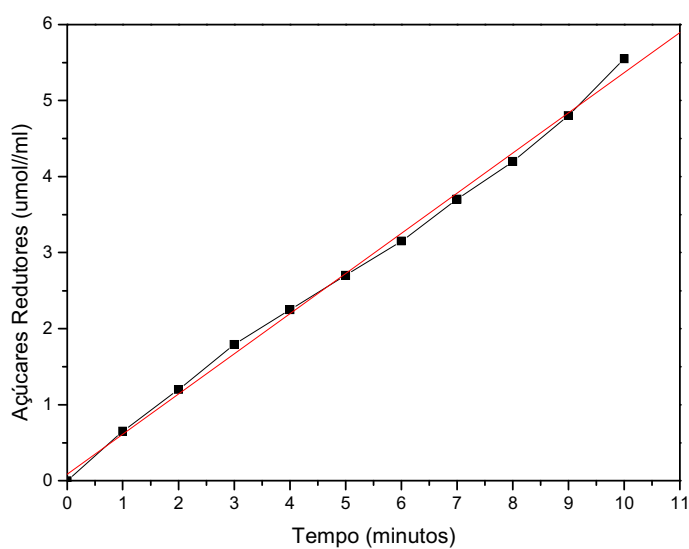


Gráfico 17 – Determinação de açúcares redutores formados em função do tempo (0,1ml de extrato enzimático + 0,9ml de sacarose 10% em tampão acetato de sódio 0,05mM pH 5,0 (■)).

Posteriormente foi realizada uma regressão linear obtendo-se a equação da reta $Y = 0,08682 + 0,52791 \cdot X$. Portanto, a velocidade inicial de reação (V_0) é igual a 0,52791 (umol//ml.min).

5.2.1.2 - Determinação do pH Ótimo

De acordo com o Gráfico 18, pode-se observar uma variação da atividade de hidrólise de sacarose na faixa de pH entre 3,5 e 7,0 e picos de atividade enzimática em valores de pH 4,0, 5,0 e 6,5.

Tendo sido utilizado um extrato enzimático bruto para a determinação da atividade de sacarase não há meios de saber qual o pH ótimo de atuação de cada uma das enzimas que hidrolisam a sacarose. Entretanto, pode-se afirmar que o máximo valor de atividade enzimática foi conseguido em pH 4,0, sendo este, portanto, considerado o pH ótimo para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto.

De acordo com a literatura, ao fermentar meios que contém sacarose, a bactéria *Zymomonas mobilis* produz somente duas enzimas que tem atividade de sacarase, ou seja, a sacarase e a levanasacarase. Entretanto talvez haja a produção de uma terceira enzima, ainda não estudada, como demonstrada pelos picos encontrados no Gráfico 18.

Ao compararmos o pH ótimo (4,0) encontrado para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto (Gráfico 18) e dados citados na literatura, observamos que são diferentes. As maiores atividades das enzimas sacarase extracelular cristalizada, purificada e produzida por *Zymomonas mobilis* IFO 13756 e das levanasacarases de *Zymomonas mobilis* NCIB 11199, ocorrem em pH 5,5 e pH 6,5, respectivamente (YANASE et al.,1995; LYNESS e DOELLE, 1983). Entretanto nota-se que esses dois valores são encontrados nos dois outros picos de atividade (Gráfico 18).

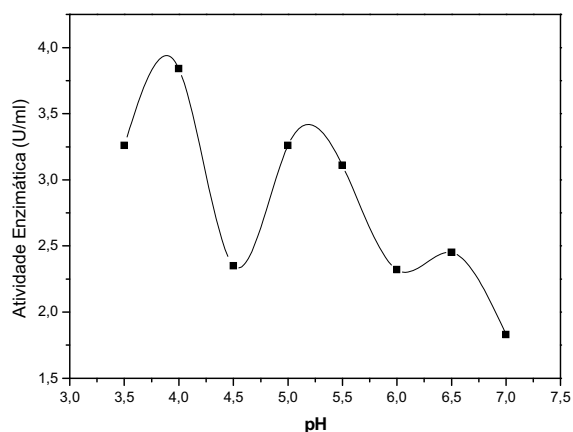


Gráfico 18 – Determinação do pH ótimo para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto, em meio reacional composto por 10% de sacarose em diferentes tampões e valores de pH na concentração 0,05M, e reação a 30°C por 10 minutos.

5.2.1.3 – Determinação da Temperatura Ótima

O Gráfico 19 mostra a variação da atividade de sacarase do extrato enzimático bruto em função da temperatura na faixa de 20 a 45°C, e a temperatura ótima de 40°C.

Isto é similar às temperaturas ótimas encontradas para as atividades de hidrólise de sacarose da enzima levanasacarase produzida por diferentes microrganismos (YANASE et al., 1992; SANGILIYANDI et al., 1999; AMMAR et al., 2002) e para a enzima sacarase extracelular de *Zymomonas mobilis* IFO 13756, cristalizada e purificada (YANASE et al., 1995).

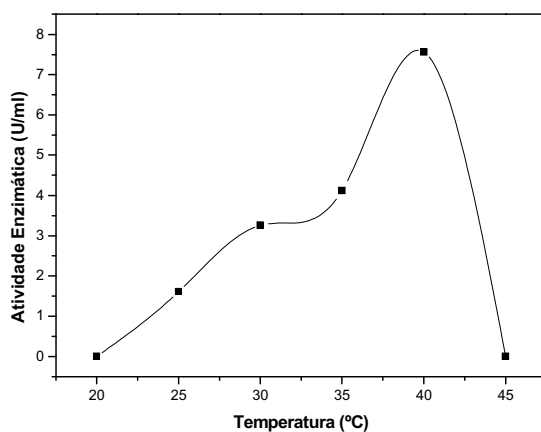


Gráfico 19 – Determinação da temperatura ótima para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto, em meio reacional composto por 10% de sacarose em tampão acetato de sódio 0,05M e pH 5,0, e reação a diferentes temperaturas (20 a 45°C) por 10 minutos.

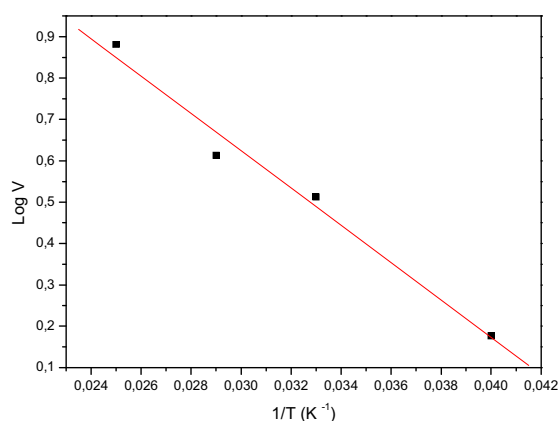


Gráfico 20 – Determinação da Energia de Ativação necessária para ocorrer a reação de hidrólise de sacarose pelo extrato enzimático bruto.

O Gráfico 20 mostra a determinação da energia de ativação da reação e para o cálculo desta utilizaram-se os dados de $1/T \times \log V$.

Por meio da regressão linear obteve-se a equação da reta $Y = 1,97781 - 45,11527 \cdot X$. Visto que $E_a = - (2,3 \times \text{tg} \alpha \times R)$. A $\text{tg} \alpha$ é conseguida pela equação da reta ($- 45,11527$) e $R = 1,98 \text{ cal/mol.K}$, sendo, assim, a energia de ativação necessária para a reação igual a $205,45 \text{ cal/mol}$.

5.2.1.4 – Efeito da Concentração de Sacarose

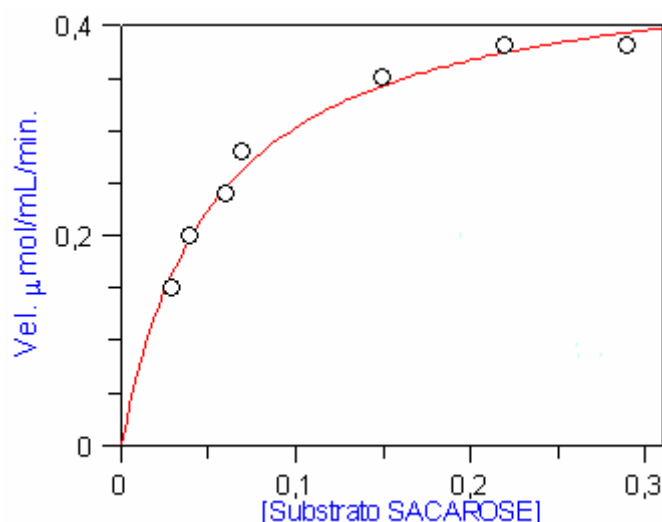
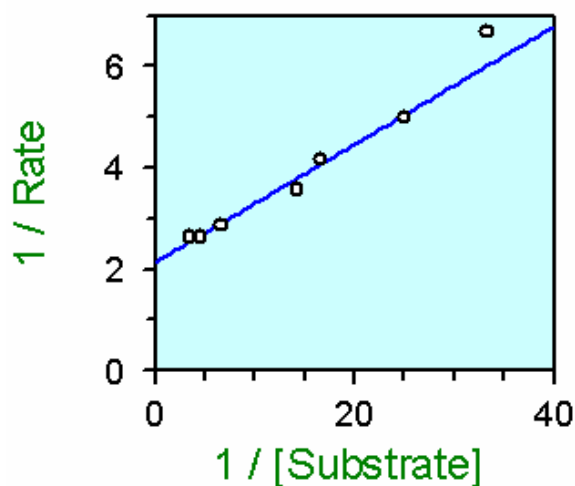


Gráfico 21 – Efeito da concentração de sacarose sobre a velocidade enzimática de sacarase do extrato enzimático bruto. Os ensaios foram realizados com 0,1ml de extrato bruto e 0,9mL de tampão 50mM e pH 4,0 com diferentes concentrações de sacarose e temperatura de reação 40°C.

Pode – se observar no Gráfico 21 que a velocidade enzimática aumentou quase linearmente com o aumento da concentração de sacarose. Isso ocorreu nas concentrações de 0 até 0,10M, após este valor houve a saturação da enzima pelo substrato. A partir desse ponto (0,10M), a velocidade inicial observada atingiu um valor máximo que não é afetado por aumentos posteriores da concentração de substrato, pois o mesmo se encontra em excesso sobre a enzima.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos V_{Max} e K_M é necessário linearizar os dados obtidos durante a determinação do efeito da concentração do substrato na velocidade enzimática. Com essa finalidade, foi plotado o Gráfico 22, no qual consta os dados de $1/V_0$ versus $1/[S]$. Pela linearização obteve-se $V_{\text{Max}} = 0,47\mu\text{mol/mL.min}$ e $K_M = 54\text{mM}$.

Portanto é necessária uma adição de 0,054M de sacarose, em tampão pH 4,0, ao extrato bruto para que tenhamos V_0 igual a metade do valor de V_{Max} após 10 minutos de reação.



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,4669	0,0170
Km	0,0542	0,0058

Gráfico 22 – Linearização dos dados obtidos de Velocidade Enzimática e Concentração de Sacarose para obtenção dos parâmetros cinéticos V_{Max} e K_M .

5.2.1.5 - Determinação da Estabilidade ao pH

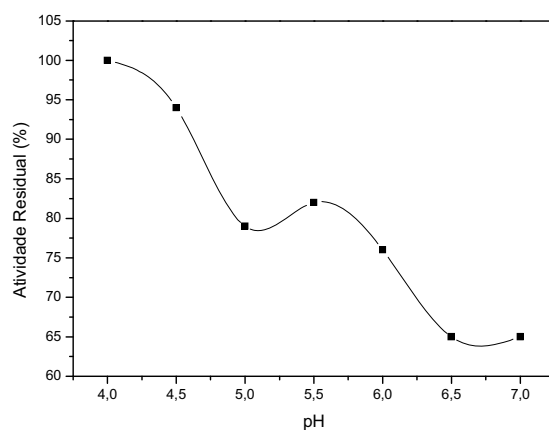


Gráfico 23 – Determinação da estabilidade ao pH do extrato enzimático bruto para atividade de sacarase. O extrato enzimático foi mantido em tampão 50mM com diferentes valores de pH (4,0 a 7,0) por 24 h em temperatura ambiente, e após foi ensaiada sua atividade sob condições ótimas.

O gráfico 23 demonstra que o extrato bruto teve a maior estabilidade em pH 4,0, mantendo 100% de sua atividade de sacarase, e em valores de pH 5,5 e 6,5 manteve praticamente 80 e 65% de sua atividade, respectivamente.

Em nosso experimento, o valor observado para atividade residual máxima (pH 4,0) está de acordo com o encontrado para a enzima levanasacarase purificada, produzida pelo microrganismo *Z. mobilis* Z6C, a qual foi estável em pH 3,5-6,0 durante 24 horas a 30°C (YANASE et al., 1992). Entretanto não está de acordo com os valores encontrados para as enzimas levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp. TH4-2 e levanasacarase de *Zymomonas mobilis* produzida por *E.coli* recombinante (AMMAR et al., 2002, SANGILIYANDI et al., 1999).

5.2.1.6 - Determinação da Estabilidade Térmica

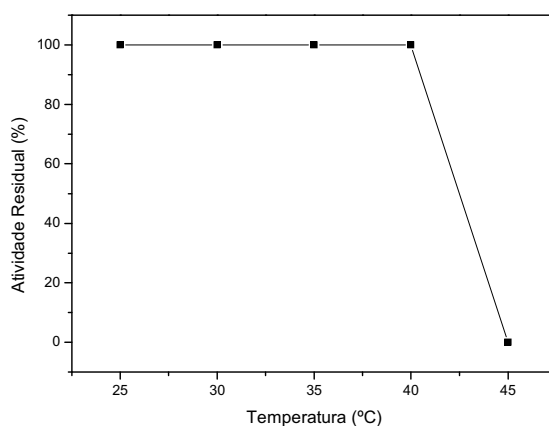


Gráfico 24 – Determinação da estabilidade térmica do extrato enzimático bruto para atividade de sacarase. O extrato enzimático bruto foi mantido por 30 minutos em diferentes temperaturas em tampão acetato de sódio pH 4,0 e 50mM. Após foi determinada a atividade de sacarase sob condições ótimas.

O extrato enzimático bruto permaneceu estável em temperaturas de 25 a 40°C, mantendo 100% de sua atividade de sacarase. Em temperaturas superiores a 40°C houve, provavelmente, a desnaturação das enzimas responsáveis pela atividade de sacarase (Gráfico 24).

Isto também foi observado por Yanase et al. (1992) que estabeleceram que a levanasacarase de *Zymomonas mobilis* é estável a 37°C após 30 minutos no seu pH ótimo. E segundo Ohtsuka et al. (1992) a enzima levanasacarase de *Rahnella aquatilis* JCM-1683 ficou estável até 40°C, mas perdeu completamente sua atividade a 70°C.

5.3 - Produção de levanasacarase em meio com diferentes valores de pH iniciais.

No Gráfico 25 são mostrados os dados obtidos das atividades enzimáticas de formação de levana, da enzima levanasacarase, determinadas no decorrer da fermentação em meios compostos por sacarose 200g/L adicionados de sais e pH inicial ajustado para 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente. Os frascos foram mantidos sob agitação a 200rpm e incubados a 30°C.

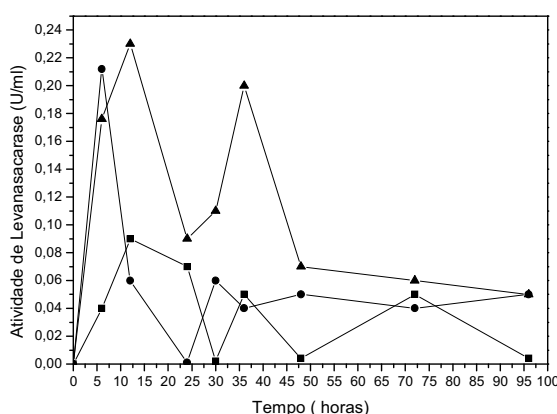


Gráfico 25 - Determinação da atividade de levanasacarase num meio ajustado a diferentes valores de pH, diferentes tempos de fermentação, agitação a 200rpm e incubados a 30°C (pH 5,0 (■); pH 6,0 (●) e pH 7,0 (▲)).

Neste Gráfico 25 pode-se observar que a maior atividade de formação de levana foi obtida em pH inicial de 7,0 e em 12 horas de fermentação. Este pico de atividade pode ser explicado pelo fato de haver, como no caso da atividade de sacarase, a maior quantidade de biomassa (Gráfico 14), e também devido à presença de uma grande concentração de frutose no meio (Gráfico 7). Esta maior atividade de formação de levana da enzima levanasacarase também ajuda a explicar o primeiro pico encontrado na produção de levana (Gráfico 8).

Dessa forma, para a caracterização do extrato enzimático quanto à atividade de formação de levana, o mesmo foi produzido pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 durante 12 horas de fermentação, em meio com pH inicial de 7,0, 200g/L de sacarose, temperatura de incubação de 30°C e agitação de 200rpm.

5.3.1 - Caracterização da levanasacarase quanto à atividade de formação de levana

5.3.1.1 – Testes preliminares realizados para a produção de levana

Foram realizados alguns testes preliminares com o intuito de verificar a inibição do crescimento das células bacterianas no meio reacional durante a produção do biopolímero, para então certificar que o mesmo é produzido somente pela enzima levanasacarase presente. Para tanto, utilizou-se sacarose estéril 200g/L em tampão acetato de sódio 50mM, cloranfenicol (10µg/mL) e temperatura de reação de 4,0°C, tendo em vista que a utilização do antibiótico foi definida de acordo com Tkachenko e Sevryugina (1989).

Nos Gráficos 26, 27 e 28 são mostrados os resultados obtidos a partir da combinação destes três diferentes parâmetros para a produção de levana pela enzima levanasacarase.

No Gráfico 26 estão os dados obtidos em meios com pH inicial de 4,0, com sacarose não estéril 20% e adição de cloranfenicol, sacarose estéril 20% e adição de cloranfenicol e os controles realizados sem a adição do antibiótico. Pode-se perceber que a maior produção ocorreu quando se utilizou sacarose não estéril e adição de cloranfenicol durante 72 horas de reação.

O Gráfico 27 demonstra os dados obtidos nos meios com pH inicial de 5,0, temperatura de reação de 30°C, com sacarose não estéril 20% e adição de cloranfenicol, sacarose estéril 20% e adição de cloranfenicol e seus respectivos controles de reação. Nesse caso, a maior produção de levana ocorreu em meio com sacarose não estéril e adição de cloranfenicol em 72 horas de reação.

Os dados obtidos pela reação entre o extrato enzimático bruto em temperatura de 4°C, com sacarose estéril 20% e pH 4,0, sacarose estéril e pH 5,0 e seus respectivos controles

de reação constam no Gráfico 28. Neste, a maior produção do biopolímero foi conseguida em meio com sacarose estéril e pH 4,0 também em 72 horas.

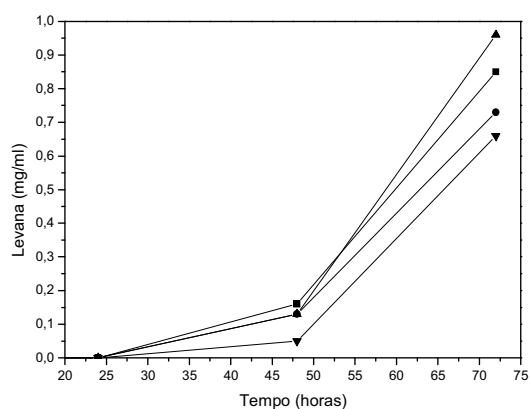


Gráfico 26 - Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com pH 4,0, 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 30°C ((■) Sacarose não estéril sem adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose não estéril e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose estéril e adição de cloranfenicol, (▼) Sacarose estéril sem adição de cloranfenicol).

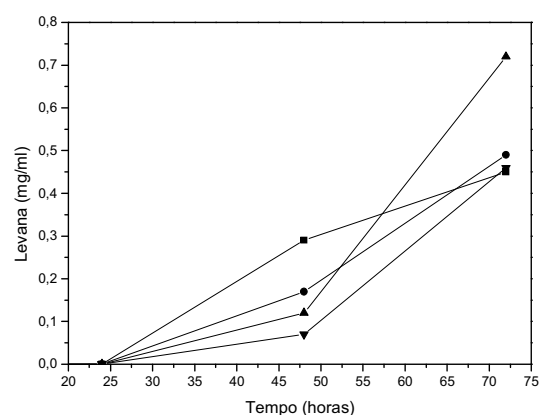


Gráfico 27 - Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com pH 5,0, 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 30°C ((■) Sacarose não estéril sem adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose não estéril e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose estéril e adição de cloranfenicol, (▼) Sacarose estéril sem adição de cloranfenicol).

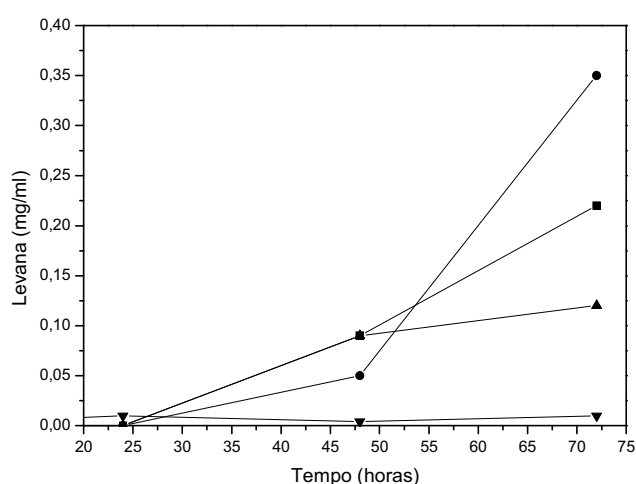


Gráfico 28 - Quantificação da levana formada (mg/mL) nos meios com 200g/L de sacarose e temperatura de reação de 4°C ((●) Sacarose estéril e pH 4,0, (■) Sacarose não estéril e pH 4,0, (▲) Sacarose não estéril e pH 5,0, (▼) Sacarose estéril e pH 5,0).

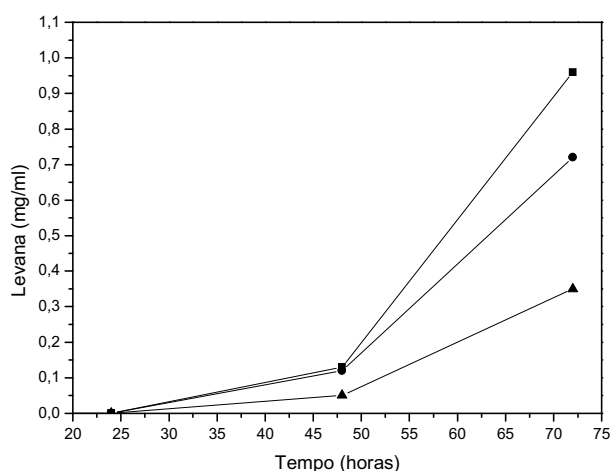


Gráfico 29 - Comparação dos melhores resultados obtidos nos testes anteriores. Os brancos de reação também foram feitos. ((■) Sacarose não esteril, pH 4,0, T = 30°C e adição de cloranfenicol, (●) Sacarose não esteril, pH 5,0, T = 30°C e adição de cloranfenicol, (▲) Sacarose esteril, pH 4,0, T = 4,0°C).

Pelo Gráfico 29 é possível comparar as três melhores condições para produção de levana pela enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto. Observa-se, portanto, que houve a maior produção do biopolímero em meio reacional composto por 200g/L de sacarose não esteril em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0, temperatura de reação de 30°C e adição de 10µg/mL de cloranfenicol. Foi verificada a ausência de crescimento por coloração de Gram.

5.3.1.2 – Caracterização da levanasacarase do extrato bruto ajustando os parâmetros envolvidos pela metodologia de superfície de resposta

As determinações de pH ótimo, temperatura ótima e melhor concentração de sacarose, para a obtenção da maior atividade de formação de levana da enzima levanasacarase, foram determinados pela metodologia de superfície de resposta, a qual avalia a influência de todas as variáveis, fatores e efeitos das interações entre as respostas.

A otimização pode ser dividida em estágios que se caracterizam pela definição da função objetivo (resposta); pela determinação dos fatores (variáveis) que apresentam

influências significativas sobre a resposta que se deseja otimizar e; pela otimização propriamente dita, que é procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultam na melhor resposta (maximização ou minimização). Desta forma, a escolha do planejamento adequado é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo, da disponibilidade de matéria-prima, da viabilidade do número de ensaios que podem ser realizados e do custo do processo em estudo. No entanto, há um número mínimo de ensaios que devem ser feitos conforme o número de fatores que se deseja estudar, para que a discussão dos resultados e a interpretação estatística não fiquem comprometidas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Neste projeto, para a determinação da melhor atividade de formação de levana da levanasacarase, presente no extrato enzimático bruto, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, seguindo um planejamento fatorial do tipo 3^{4-0} , onde as variáveis independentes estudadas foram: pH do meio reacional, tempo, temperatura de reação, e concentração de sacarose presente no meio, totalizando 81 experimentos, sendo que cada um deles foi realizado em triplicata, para a obtenção de resultados com maior grau de confiabilidade.

As variáveis independentes utilizadas foram: X_1 = concentração de sacarose g/L, X_2 = temperatura de reação em °C, X_3 = tempo de reação em horas (h), X_4 = pH. A avaliação dos efeitos das variáveis foi feita pela utilização de modelagem empírica e da estimação de parâmetros, empregando o programa Statistic 7.0, que descreve como as variáveis experimentais e suas interações influenciam na resposta.

A matriz do delineamento fracionado 3^{4-0} contemplando as 81 combinações e os resultados dos experimentos visando a obtenção da atividade enzimática de formação de levana (Y_1) pelo extrato enzimático bruto produzido pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio com sacarose 200g/L acrescido de sais, temperatura de incubação de 30°C, pH inicial de 7,0, tempo de fermentação de 12 horas e agitação de 200rpm, estão representados na Tabela 11.

Utilizando o modelo estatístico proposto foi possível calcular: as estimativas dos efeitos; as correlações entre as variáveis (p) e os coeficientes da regressão, conforme demonstrados na Tabela 12, para atividade de formação de levana (Y_1).

Os resultados obtidos nos experimentos realizados para a determinação da atividade enzimática de formação de levana do extrato bruto, produzido pela fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis*, mostraram que as variáveis independentes, concentração de sacarose e tempo de reação, e as interações entre a concentração de sacarose e a temperatura de reação e entre a concentração de sacarose e o tempo de reação foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para a atividade enzimática de formação de levana. Também pode-se

observar que os níveis foram bem escolhidos devido ao baixo valor de p encontrado para o intercepto Y_I (Tabela 12).

Tabela 11 - Matriz do delineamento fracionado 3^{4-0} contemplando as 81 combinações realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para a resposta Y_I , utilizando extrato enzimático bruto de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em tampões acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0) e MES (pH 6,0) 50mM com diferentes concentrações de sacarose, tempo e temperaturas de reação.

Corridas	Variáveis Independentes				Resposta	Açúcares Redutores (mg/ml)	Açúcares Totais (mg/ml)	Sacarose Hidrolisada (mg/ml)
	X_1	X_2	X_3	X_4	Atividade Enzimática (U/ml) $p^* = X_1, X_3, X_1 * X_2, X_1 * X_3$			
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	0	0	137,06	124,53
2	-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,00000	0	0,72	154,16	108,15
3	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	0	0	114,92	146,67
4	-1,00000	-1,00000	0,00000	-1,00000	0	0	142,66	118,93
5	-1,00000	-1,00000	0,00000	0,00000	0,08	35,75	147,32	150,02
6	-1,00000	-1,00000	0,00000	1,00000	0,01	0	128,83	132,76
7	-1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	0	2,44	134,03	130,00
8	-1,00000	-1,00000	1,00000	0,00000	0,03	23,55	128,67	156,47
9	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	0	2,89	155,01	109,47
10	-1,00000	0,00000	-1,00000	-1,00000	0	0	105,13	156,46
11	-1,00000	0,00000	-1,00000	0,00000	0	16,53	134,03	144,09
12	-1,00000	0,00000	-1,00000	1,00000	0	0,09	124,94	136,74
13	-1,00000	0,00000	0,00000	-1,00000	0,19	0,71	115,38	146,92
14	-1,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,18	90,48	69,93	261,59
15	-1,00000	0,00000	0,00000	1,00000	0,09	0,11	170,86	90,84
16	-1,00000	0,00000	1,00000	-1,00000	0	4,29	171,79	94,09
17	-1,00000	0,00000	1,00000	0,00000	0	64,18	119,58	206,19
18	-1,00000	0,00000	1,00000	1,00000	0	3,58	146,62	118,55
19	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	0	0,81	122,14	140,26
20	-1,00000	1,00000	-1,00000	0,00000	0,09	0	109,32	152,27
21	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	0,12	1,08	124,32	138,35
22	-1,00000	1,00000	0,00000	-1,00000	0	1,14	129,14	133,59
23	-1,00000	1,00000	0,00000	0,00000	0,06	0	130,30	131,29
24	-1,00000	1,00000	0,00000	1,00000	0,13	0	79,95	181,64

Continuação da Tabela 11

25	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	0,02	0,81	111,42	150,98
26	-1,00000	1,00000	1,00000	0,00000	0,11	1,76	193,71	69,64
27	-1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,12	1,20	152,60	110,19
28	0,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	0,16	0	214,92	196,67
29	0,00000	-1,00000	-1,00000	0,00000	0,47	0	161,31	250,28
30	0,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	0,35	0	201,86	209,73
31	0,00000	-1,00000	0,00000	-1,00000	0,04	0	214,22	197,37
32	0,00000	-1,00000	0,00000	0,00000	0,2	10,85	213,52	208,92
33	0,00000	-1,00000	0,00000	1,00000	0,03	0	224,71	186,88
34	0,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	0	0,88	186,95	225,52
35	0,00000	-1,00000	1,00000	0,00000	0,32	23,56	262,70	172,45
36	0,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	0,13	5,77	249,18	168,18
37	0,00000	0,00000	-1,00000	-1,00000	0,12	0	194,64	216,95
38	0,00000	0,00000	-1,00000	0,00000	0,09	4,68	249,42	166,85
39	0,00000	0,00000	-1,00000	1,00000	0,43	0,98	288,11	124,46
40	0,00000	0,00000	0,00000	-1,00000	0	0,72	229,60	182,71
41	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0	100,68	214,22	298,05
42	0,00000	0,00000	0,00000	1,00000	0	0,79	292,77	119,61
43	0,00000	0,00000	1,00000	-1,00000	0,11	5,90	206,06	211,43
44	0,00000	0,00000	1,00000	0,00000	0	23,56	248,95	186,20
45	0,00000	0,00000	1,00000	1,00000	0	4,27	180,65	235,21
46	0,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,65	0,69	334,27	78,01
47	0,00000	1,00000	-1,00000	0,00000	1,83	0	271,10	140,49
48	0,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	1,06	1,18	370,86	41,91
49	0,00000	1,00000	0,00000	-1,00000	0	2,09	286,95	126,73
50	0,00000	1,00000	0,00000	0,00000	0	0	297,67	113,92
51	0,00000	1,00000	0,00000	1,00000	0	0	242,19	169,40
52	0,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	0	1,07	209,56	203,10
53	0,00000	1,00000	1,00000	0,00000	0,26	0,41	286,25	125,75
54	0,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,58	0,04	281,12	130,51
55	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	5,5	0	382,28	179,31
56	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,00000	3,36	0	377,39	184,20
57	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	0,26	0	414,69	146,90
58	1,00000	-1,00000	0,00000	-1,00000	0,08	0	396,04	165,55
59	1,00000	-1,00000	0,00000	0,00000	0	1,90	384,15	179,34
60	1,00000	-1,00000	0,00000	1,00000	0	0	424,94	136,65
61	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	0,38	0	310,02	251,57

Continuação da Tabela 11

62	1,00000	-1,00000	1,00000	0,00000	0,08	23,56	347,79	237,36
63	1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	0,13	1,23	249,57	313,25
64	1,00000	0,00000	-1,00000	-1,00000	0,44	0	353,61	207,98
65	1,00000	0,00000	-1,00000	0,00000	0,38	0	493,55	68,04
66	1,00000	0,00000	-1,00000	1,00000	0,38	0	372,73	188,86
67	1,00000	0,00000	0,00000	-1,00000	0,01	0,45	433,10	128,94
68	1,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,15	21,16	378,79	203,96
69	1,00000	0,00000	0,00000	1,00000	0,18	1,83	365,73	197,69
70	1,00000	0,00000	1,00000	-1,00000	0,05	5,94	268,76	298,77
71	1,00000	0,00000	1,00000	0,00000	0,67	143,03	331,70	372,92
72	1,00000	0,00000	1,00000	1,00000	0,59	8,49	235,20	334,88
73	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,59	0,46	514,69	47,36
74	1,00000	1,00000	-1,00000	0,00000	0	0,09	387,88	173,80
75	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	0,16	0	313,29	248,30
76	1,00000	1,00000	0,00000	-1,00000	0,11	2,35	388,58	175,36
77	1,00000	1,00000	0,00000	0,00000	0,02	0,29	506,29	55,59
78	1,00000	1,00000	0,00000	1,00000	0,46	3,09	516,78	47,90
79	1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	0	1,49	484,85	78,23
80	1,00000	1,00000	1,00000	0,00000	0,08	0	468,30	93,29
81	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,35	1,98	430,30	133,27

X_1 = Concentração de Sacarose (%); X_2 = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X_3 = Tempo (h); X_4 = pH.

* p = variável independente significativa estatisticamente ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Tabela ANOVA resumida referente à estimativa dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta atividade de formação de levana (Y_l), utilizando o extrato enzimático bruto produzido por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio contendo 200g/L de sacarose acrescido de sais minerais, temperatura de incubação de 30 $^{\circ}\text{C}$, agitação de 200rpm, pH inicial de 7,0 e 12 horas de fermentação.

Variáveis	Y_l		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	0,277	0,000	0,277
X_1	0,488	0,008	0,244
X_2	-0,178	0,318	-0,089
X_3	-0,460	0,012	-0,230
X_4	-0,107	0,548	-0,054
$X_1.X_2$ *	-0,475	0,033	-0,238
$X_l.X_3$ *	-0,489	0,028	-0,245

*Variáveis que influenciaram na atividade enzimática ($p < 0,05$). X_l (concentração de sacarose); X_2 (Temperatura); X_3 (tempo); X_4 (pH); e Y_l (atividade de formação de levana).

Pode-se notar nos Gráficos 30, 31 e 32 confeccionados utilizando a metodologia de superfície de resposta que a concentração de sacarose influenciou de maneira positiva (*Coeficiente* > 0) na atividade de formação de levana, sendo o maior valor obtido em elevadas concentrações (40-45%), estando de acordo com Ammar et al. (2002) que observaram um aumento da produção do biopolímero, pela enzima levanasacarase de *Bacillus* sp. TH4-2, com o aumento da concentração de sacarose no meio reacional, alcançando o máximo em solução de sacarose 36%.

Todavia a interação entre a concentração de sacarose e a temperatura de reação influenciou negativamente (*Coeficiente* < 0) e os máximos valores de atividade enzimática foram encontrados nas mais baixas temperaturas testadas (18-22°C) (Gráfico 30 – Atividade Enzimática (U/ml) = $2,23284 + 0,00812*x + 0,00016*x^2 - 0,12324*y + 0,00191*y^2 - 0,59630$ (onde x= concentração de sacarose (%) e y = temperatura de reação (°C)). Hettwer et al. (1995) e Yanase et al. (1992), também estabeleceram que as enzimas levanasacarase de *Pseudomonas syringae* e *Zymomonas mobilis* Z6C possuem a maior atividade para a produção de levana em 18°C e 15°C, respectivamente. Entretanto existem diversos autores que estabeleceram essa temperatura ótima em 30°C (SANGILIYANDI e GUNASEKARAN,1998; SANGILIYANDI et al., 1999; KANG et al., 2005, SANGILIYANDI e GUNASEKARAN, 2001) enquanto neste experimento foi de 20°C.

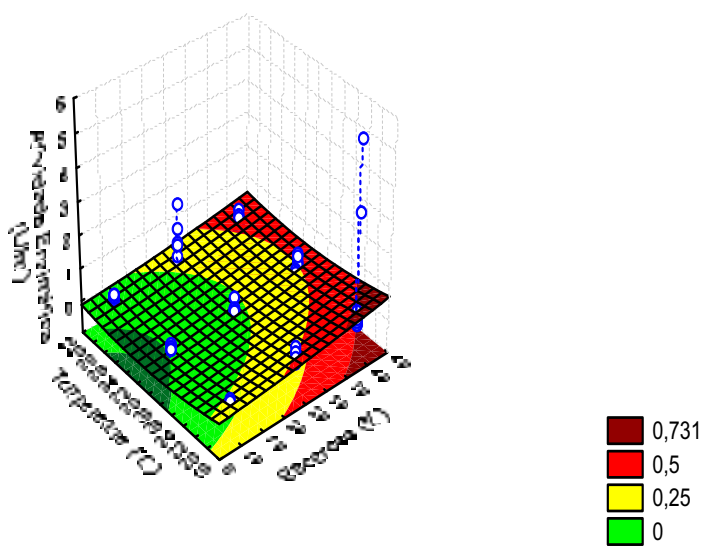


Gráfico 30 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e temperatura de reação (°C).

O tempo de reação (Gráficos 31, 32 e 34) também influenciou de maneira negativa (*Coeficiente* < 0), como também a interação da concentração de sacarose e tempo de reação (Gráfico 31) sobre a atividade de formação de levana, visto que nos menores tempos de reação (20-24 horas) foram obtidas as maiores atividades enzimáticas (Gráfico 31 – Atividade Enzimática (U/ml) = $2,23284 + 0,00812*x + 0,00016*x^2 - 0,06024*y + 0,00053*y^2 - 0,90259$ (onde x = concentração de sacarose (%)) e y = tempo de reação (°C)) e Gráfico 32 - Atividade Enzimática (U/ml) = $2,23284 - 0,12324*x + 0,00191*x^2 - 0,06024*y + 0,00053*y^2 + 1,38457$ (onde x = temperatura de reação (°C) e y = tempo de reação (°C)), estando os dados encontrados também de acordo com Ammar et al. (2002).

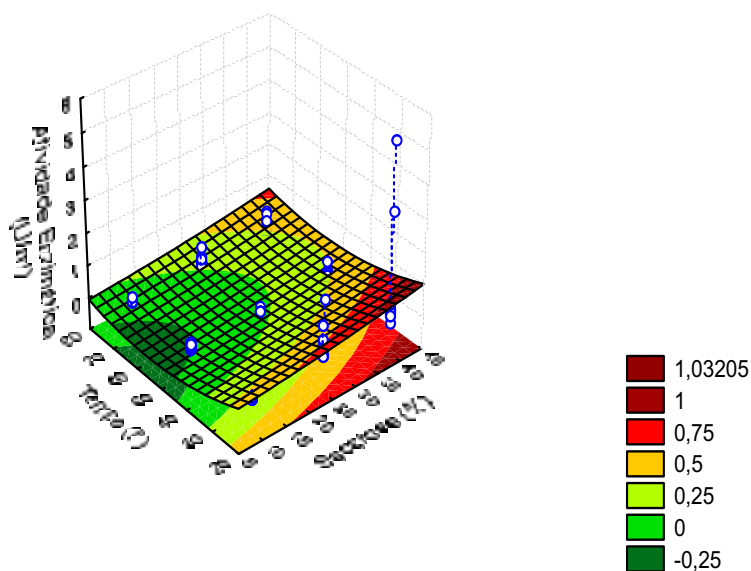


Gráfico 31 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e tempo de reação (horas).

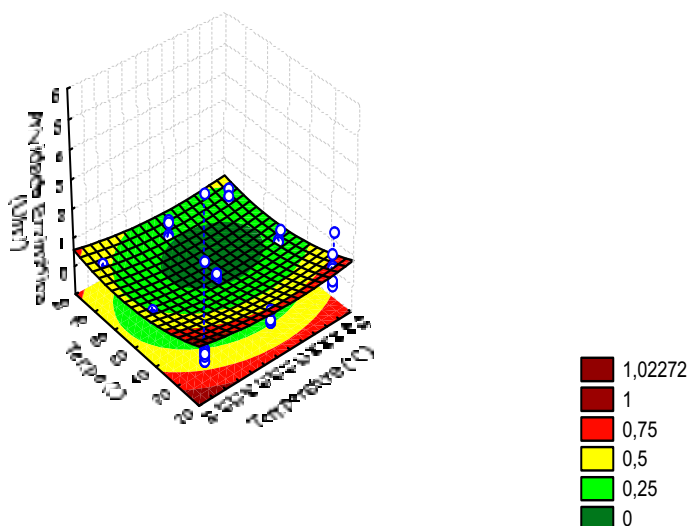


Gráfico 32 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da temperatura de reação (°C) e tempo de reação (horas).

Já o fator pH não foi estatisticamente significativo (Gráficos 33 e 34), entretanto pode-se notar que as maiores atividades de formação de levana da enzima levanasacarase foram obtidas entre os valores de pH 4,0 e 5,5, havendo uma queda entre pH 5,6 e 6,0 (Gráfico 33 – Atividade Enzimática (U/ml) = $2,23284 + 0,00812 \cdot x + 0,00016 \cdot x^2 + 0,48537 \cdot y - 0,05389 \cdot y^2 - 3,65814$ (onde x = concentração de sacarose (%) e y = pH) e Gráfico 34 - Atividade Enzimática (U/ml) = $2,23284 - 0,06024 \cdot x + 0,00053 \cdot x^2 + 0,48537 \cdot y - 0,05389 \cdot y^2 - 1,67728$ (onde x = tempo de reação (horas) e y = pH)). Os valores de pH ótimo encontrados para a atividade de formação de levana pela enzima levanasacarase, quando produzida por diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*, são diferentes. Swings e De Ley determinaram que o pH ótimo para a atividade da enzima levanasacarase é de 6,5, Sangiliyand et al. (1999), Yanase et al. (1992) e Song et al. (1993) determinaram esse valor em 5,0 e Crittenden e Doelle (1994) determinaram o valor ótimo igual a 5,5 .

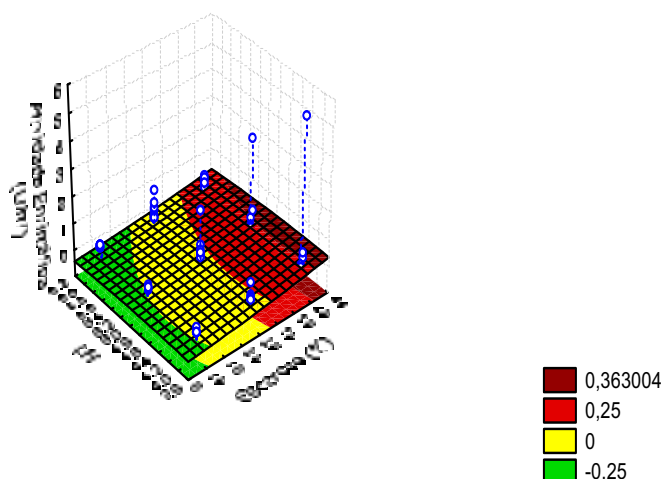


Gráfico 33 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (%) e pH.

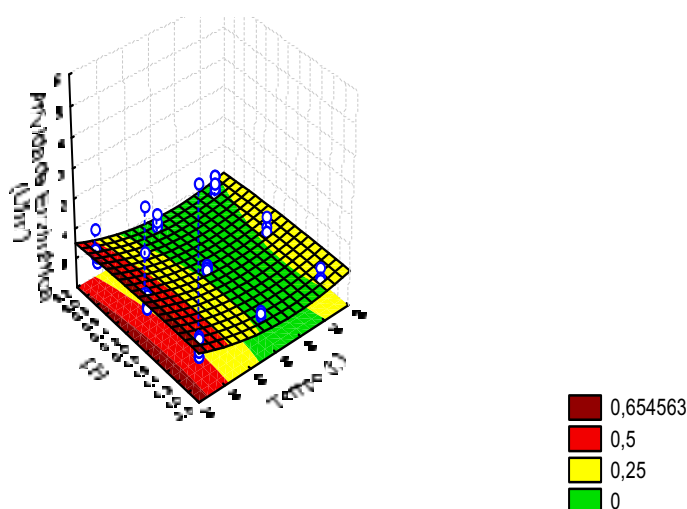


Gráfico 34 - Superfícies de resposta para a atividade enzimática (U/mL) ao redor dos valores ótimos do tempo de reação (horas) e pH.

Em nosso experimento a maior atividade de formação de levana foi obtida em meio reacional com 400g/L de sacarose, temperatura e tempo de reação de 20°C e 24 horas, respectivamente, em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0. Também foi detectada a hidrólise relativa de 31,93% da sacarose presente no meio reacional e nenhuma produção de açúcares redutores. Somente 4,42% da sacarose hidrolisada foi utilizada para a produção do biopolímero levana (7,92 mg/ml), sendo que o restante do substrato pode ter sido convertido em outros compostos. Apesar destes bons resultados, a produção de levana pelo extrato enzimático ainda é inferior ao relatados por Ammar et al. (2002), que alcançaram valores de 200mg/ml utilizando a

enzima levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp TH4-2 em solução de sacarose 36%, temperatura de reação de 50°C após de 24 horas de reação.

Mesmo sendo pouca a quantidade de sacarose hidrolisada convertida em levana, o extrato enzimático bruto produziu 27 vezes mais este biopolímero em relação ao microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494 durante sua fermentação em meio contendo sacarose (Gráfico 8).

5.3.1.3 - Estabilidade ao Congelamento

Verificou-se que a atividade enzimática de formação de levana do extrato enzimático bruto foi estável quando submetido ao congelamento durante 3 meses, não havendo perda da mesma (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeito do Congelamento sobre a atividade de formação de levana da enzima levanasacarase presente no extrato enzimático bruto produzido por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Tempo de Congelamento do Extrato Enzimático (dias)	Atividade Enzimática de Formação de Levana (% Relativa)
0	100
15	96
30	98
45	97
60	96
75	95
90	97

5.3.1.4 - Efeito de alguns Íons Metálicos

Foram testados três diferentes íons metálicos, CaCl_2 , KCl e MgSO_4 , sobre a atividade enzimática de formação de levana da enzima levanasacarase presente no extrato enzimático produzido pela fermentação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Várias pesquisas também foram realizadas com o objetivo de observar a influência desses diferentes íons metálicos, presentes no meio reacional, sobre a atividade da enzima levanasacarase produzida por diferentes microrganismos. Vigants et al. (1998) e Ohtsuka et al. (1992) perceberam uma ativação direta da levanasacarase *in vitro* quando adicionado ao meio reacional o sal KCl . Jang et al. (2001) observaram que a presença de CaCl_2 aumentou a atividade da enzima levanasacarase, livre e imobilizada em superfície de magnetita, de *Zymomonas mobilis* enquanto Van Hijum et al. (2001) também observaram que íons cálcio são requeridos pela enzima fructosiltransferase (FTF) de *Lactobacillus reuteri* linhagem 121 para sua atividade.

Resultados semelhantes podem ser encontrados nesta pesquisa, pois CaCl_2 e KCl , não surtiram efeito positivo sob a atividade enzimática, ao aumentar a atividade enzimática em 20,0 e 10,0%, respectivamente. Jacques (1984) relataram que os íons Ca^{2+} podem estabilizar enzimas FTF, como observado em *S. salivarius*. Neste experimento a adição de MgSO_4 , não teve efeito sobre a atividade enzimática da levanasacarase produzida por *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Ohtsuka et al. (1992) observaram que ao adicionar MgSO_4 ao meio reacional houve a diminuição da atividade enzimática em 0,3%. Esta diferença deve-se as diferentes condições experimentais utilizadas.

6 – CONCLUSÕES

As condições para a produção do biopolímero foram diferentes quando realizada por fermentação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (meio de cultura com sacarose 200 g/L adicionada de sais, pH inicial de 6,0, temperatura e tempo de incubação de 30°C e 96 horas, respectivamente) ou por seu extrato enzimático bruto (tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,0 contendo sacarose 40%, temperatura e tempo de reação de 20°C e 24 horas, respectivamente).

A maior quantidade de levana foi produzida pela reação do extrato enzimático bruto e sacarose (7,92 mg/ml). Isso talvez possa ser explicado pelo fato da enzima levanasacarase possuir maior especificidade ao substrato, e também pela interferência negativa na atividade enzimática dos compostos produzidos durante a fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

As condições criadas pelo meio de cultura contendo sacarose e pH inicial de 7,0 propiciaram a obtenção das maiores atividades de hidrólise de sacarose e de formação de levana, do extrato enzimático bruto. Estas foram obtidas em 6 e 12 horas de fermentação, respectivamente.

As melhores condições para as maiores obtenções das atividades de sacarase e de formação de levana, ambas *in vitro*, são diferentes quanto à temperatura e tempo de reação e concentração de sacarose.

7 – REFERÊNCIAS

- AIT- ABDELKADER, N.; DE CARO, A.; GUZZO, J.; GÉRARD, P.F.; BARATTI, M.; BARATTI, J.C. The intracellular sucrase (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. *Biotechnology Letters*, Netherlands, v. 22, p. 461- 467, 2000.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 87, n. 2, p. 214-217, 1999.
- ANDERSONE, I.; AUZINA, L.; VIGANTS A.; MUTERE, O.; ZIKMANIS, P. Formation of levan from raffinose by levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Engineering in Life Sciences*, Weinheim, v. 4, n. 1, p. 56-59, 2004.
- AVIGAD, G. *Levans*. In: BIKALES, N. M.; CONRAD, J. (Ed.). *Encyclopedia of polymer science and technology*. New York: John Wiley & Sons, v. 8, p. 711-718, 1968.
- BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; LAUKEVICS, J.; GRUBE, M.; VIGANTS, A.; LINDE, R. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, London, vol. 40, p. 1535-1539, 2005.
- BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 55, p. 147-150, 2000.
- BELGHITH, H.; SONG, K. B.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnology Letters*, London, v. 18, p. 467-472, 1996.
- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANCA, F. P. Antitumor activity of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, London, v. 19, n. 1, p. 19-21, 1997.

- CHAMBERT, R.; GONZY-TRÉBOUL, G.; DEDONDER, R. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal Biochemistry*, New York, v. 41, p. 285-300, 1974.
- COTE, G. L. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnology Letters*, London, v. 10, n. 12, p. 879-882, 1988.
- COTE, G. L.; IMAM, S. H. Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 190, p. 299-307, 1989.
- COTÉ, G. L.; AHLGREN, J. A. Metabolism in microorganisms. Levan and levansucrase. In: SUZUKI, N.; CHATTERTON, N. J. (Ed.). *Science and technology of fructans*. Boca Raton: CRS Press, 1993. p.142-168.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 41, p. 302-308, 1994.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. *Biotechnology Letters*, London, v. 15, n. 10, p. 1055-1060, 1993.
- CROMIE S.; DOELLE, H.W. Limitations in substrate utilization efficiency by *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 14, p. 69, 1982.
- DADDS, M. J. S.; MARTIN, P. A.; CARR, J. G. The doubtful status of the species *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 36, p. 531-539, 1973.
- DAWES, E.; RIBBONS, D. W.; REES, D.A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *The Biochemical Journal*, London, v. 98, p. 804-812, 1966.
- DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, New York, v. 8, p. 500-505, 1966.
- DENICH, T. J.; BEAUDETTE, H. L; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 52, p. 149-182, 2003.

- DOELLE, H.W; GREENFIELD. The productions of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v. 22, p. 405-410, 1985.
- DOELLE, M.; MILLICHIP, R.; DOELLE, H. W. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, London, v. 15, p. 137-140, 1989.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Science and industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, London, v. 13, p. 57-98, 1993.
- DOELLE, H. W. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 14, p. 241, 1982.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Ohio, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ERNANDES, F. M. P. G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar). 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: Aspectos Tecnológicos, Características e Produção. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 26, p. 15-19, 2005.
- EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, London, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 14, p. 6-10, 1983.
- FARIA, L. H. G. B. Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.
- GRUBE, M.; BEKERS, M.; UPITE, D.; KAMINSKA, E. IR-spectroscopic studies of *Zymomonas mobilis* and levan precipitate. *Vibrational Spectroscopy*, Amsterdam, v. 28, p. 277-285, 2002.

- GUNASEKARAN, P.; KARUNAKARAN, T.; MUKUNDAN, A.G. PREZIOSI, L.; BARATTI, J. Cloning and sequencing of the SacA gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, Washington, vol. 172, p. 6727 – 6735, 1990.
- HAN, Y.W. J. Levan Production in *Bacillus polymyxa*. *Journal of Industrial Microbiology*, Hampshire, vol. 4, p. 447-452, 1989.
- HARTMEIER, W.; REISS, M.; HEIDEL, M.; MARX, S. Biochemical and economical aspects of levan synthesis by *Zymomonas mobilis*. *Biocatalysis*, Berks, v. 10, p. 131-136, 1994.
- HERNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; SELMAN, G.; PETIT-GLATRON, M. F.; CHAMBERT, R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *The Biochemical Journal*, London, v. 309, p. 113-118, 1995.
- HESTRIN, S.; AVIGAD, G. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Transfer of fructose to C-1 of aldose by levansucrase. *The Biochemical Journal*, London, v. 69, p. 388-398, 1958.
- HESTRIN, S.; FEINGOLD, D. S.; AVIGAD, G. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *The Biochemical Journal*, London, v. 64, n. 2, p. 340-351, 1956.
- HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv Phaseolicola. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 177, n. 10, p. 2834-2839, 1995.
- IIZUCA, M.; YAMAGUCHI, H.; ONO, S.; MINAMIURA, N. Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 322-324, 1993.
- IIZUKA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, S.; YONEDA, Y.; ITOKAWA, S.; HIYAMA, M.; ITO, K.; FURUICHI, K.; MINAMIURA, N.; YAMAMOTO, T. Syntesis of fructan and oligosaccharides by microbial and plant fructosyltransferase. *Denpun Kagaku*, Tokyo, v. 38, p. 217-222, 1991.
- JACQUES, N. A. The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytologist*, Cambridge, v. 123, p. 429-435, 1993.
- JACQUES, N. A. Calcium dependence of the cell-associated fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 127, p. 349-355, 1984.

- JANG, K. H.; SONG, K. B.; PARK, B. S.; KIM, C. H.; CHUNG, B. H.; CHOUE, R. W.; LEE, K. S.; LEE, C.; CHUN, U. H.; RHEE, S. K. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochemistry*, London, v. 37, p. 339-343, 2001.
- KANG, H. K.; SEO, M. Y.; SEO, E. S.; KIM, D.; CHUNG, S. Y.; KIMURA, A.; DAY, D. F.; ROBYT, J. F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1727, p. 5-15, 2005.
- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 75, n. 4, p. 265-270, 1993.
- KEITH, J.; WILEY, B.; BALL, D.; ARCIDIACONO, S.; ZORFASS, D.; MAYER, J.; KAPLAN, D. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 38, n. 5, p. 557-560, 1991.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek; *Journal of Microbiology and Serology*, vol. 34, p. 393-408, 1968.
- KIM, D.; ROBYT, J. F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 16, p. 1010-1015, 1994.
- KIM, K. H.; CHUNG, C. B.; KIM, Y. H.; KIM, K. S.; HAN, C. S.; KIM, C. H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *International Journal of Cosmetic Science*, London, v. 56, n. 6, p. 395-406, 2005.
- KIM, H. J.; YANG, J. Y.; LEE, H. G.; CHA, J. H. Cloning and sequence analysis of a levansucrase gene from *Rhanella aquatilis* ATCC 15552. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 11, p. 639-699, 2001.
- KOJIMA, I.; SAITO, T.; IIZUKA, M.; MINAMIURA, M.; ONO, S. Characterization of levan produced by *Serratia* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 75, p. 9-12, 1993.
- LIEPA, V.; ZAKENFELDS, G.; VOLPE, E.; KORONOVA, Z.; LAPSA, R.; LAIVENIEKS, M.; BEKERIS, M.; POSPISHIL, I. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiates mice, and enhances the antitumor activity of leukocytes. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, Baltimore, v. 5, p. 59-64, 1993.

- LYNESS, E. W.; DOELLE H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, London, v. 5, n. 5, p. 345-350, 1983.
- LYNESS, E. W.; DOELLE H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, London, v. 2, p. 549-554, 1980.
- MATOON, J.; HOLMULUND, C. E.; SCHEPARTZ, S. A.; VAVRA, J. J.; JOHNSON, M. J. Bacterial levans of intermediate molecular weight. *Applied Microbiology*, Washington, v. 3, n. 6, p. 321-333, 1955.
- MORTATTI, M. P. L. Estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose por *Zymomonas mobilis*. 1985. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.
- MURO, A. C; RODRIGUEZ, E.; ABATE, C. M.; SIÑERIZ, F. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnology Letters*, New England, v. 22, p. 1639-1642, 2000.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, Washington, v. 153, p. 375-380, 1944.
- OHTSUKA, K.; HINO, S.; FUKUSHIMA, T.; OZAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 56, n. 9, p. 1373-1377, 1992.
- PREZIOSI, L.; MICHEL, G. P. F.; BARATTI, L. Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. *Archives of Microbiology*, Berlin, v. 153, p. 181-186, 1990.
- RODRÍGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. *Biotechnology Letters*, London, v. 8, p. 745-748, 1986.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1 Ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005, 326 p.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering*, New York, v. 23, p. 37-84, 1982.

- SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. *Process Biochemistry*, London, v. 36, p. 543-548, 2001.
- SANGILIYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, London, v. 21, p. 179-182, 1999.
- SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 153-156, 1998.
- SILVA, M. C. P. Influência do pH sobre a produção de levana pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meio à base de sacarose. 1996. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.
- SOMOGY, M. A new reagent for determination of sugar. *Journal of Biology and Chemistry*, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SONG, D. D.; JACQUES, N. A. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *The Biochemical Journal*, London, v. 341, p. 285-291, 1999.
- SONG, K. B.; RHEE, S. K. Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, London, v. 16, p. 1305-1310, 1994.
- SONG, K. B.; JOO, H. K.; RHEE, S. K. Nucleotide sequence levansucrase gene (levU) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1173, p. 320-324, 1993.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 145, p. 301-307, 1996.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 38, p. 319-328, 1998.
- SUZUKI, M. & CHATTERTON. Science and Technology of Fructans. CRC Press. Boca Raton, Florida, 1993.

- SWINGS, J.; DE LEY, J. Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, Washington, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.
- TANAKA, T.; YAMAMOTO S.; OI, S.; YAMAMOTO, T. Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 90, p. 521-526, 1981.
- TANAKA, T.; OI, S.; YAMAMOTO, T. Molecular-structure of low and high molecular-weight levans synthesized by levansucrase. *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 87, p. 297-303, 1980.
- TANAKA, T., OI, S.; YAMAMOTO, T. Synthesis of levan by levansucrase: Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 85, p. 287-293, 1979.
- TANAKA, T.; OI, S.; IIZUKA, M.; YAMAMOTO, T. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 42, p. 323-326, 1978.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 93-98, 2002.
- TKACHENKO, A.A.; SEVRYUGINA, T.V. Biosynthesis of Levan by *Bacillus polymyxa*. *Microbiology*, New York, v. 58, n. 3, p. 457-461, 1989.
- UEDA, M.; SASHIDA, R.; MORIMOTO, Y.; OHKISHI, H. Purification of inulin fructotransferase (DFA I-producing) from *Arthrobacter* sp. MC12493 and production of DFA I from inulin by the enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, v. 58, n. 3, p. 574-575, 1994.
- VAN HIJUM, S. A. F. T.; BONTING, K.; VAN DER MAAREI, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 205, p. 323-328, 2001.
- VIGANTS, A.; HICKE, H. G.; MARX, S. P. A simple and efficient method for the purification of membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*, New York, v. 42, n. 6, p. 415-418, 2001.
- VIGANTS, A.; KRUCÉ, R.; BEKERS, M.; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride addition. *Biotechnology Letters*, Netherlands, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 1998.

- VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 19, p. 252-255, 1984.
- VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 23, p. 240-244, 1986.
- YAMAMOTO, S.; IIZUKA, M.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, T. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 343-349, 1985.
- YANASE, H.; IWATA, M.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, Crystallization, and Characterization of the Extracellular Invertase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 79, n. 4, p. 367-369, 1995.
- YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization and properties of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, v. 56, n. 8, p. 1335-1337, 1992.
- YANASE, H.; FUKUSHI, H.; UEDA, N.; MAEDA, Y.; TOYODA, A.; TONOMURA, K. Cloning, sequencing, and characterization of the intracellular invertase gene from *Zymomonas mobilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 55, p. 1383-1390, 1991.
- YOO, S.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H. G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 34, p.1-2; 2004.
- YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by *Zymomonas mobilis* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 70, p. 269-271, 1990.
- WENDT, R. Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis*. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- ZIKMANIS, P.; SHAKIROVA, L.; BALTKALNE, M.; ANDERSONE, I.; AUZINA, L. The effect of amphiphilic compounds on the secretion of levansucrase by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, London, v. 40, p. 3723-3731, 2005.

ANEXO

Tabela 4 - Valores de absorvância de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a 570 nm, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após pré-fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.

Diluição	Peso Celular Seco (PCS) (mg/mL)	ABS (570 nm)
1:27	0,133	0,115
1:25	0,148	0,134
1:22	0,166	0,148
1:20	0,190	0,174
1:17	0,222	0,197
1:15	0,266	0,246
1:10	0,333	0,291
1:7,5	0,443	0,390
1:5	0,665	0,682

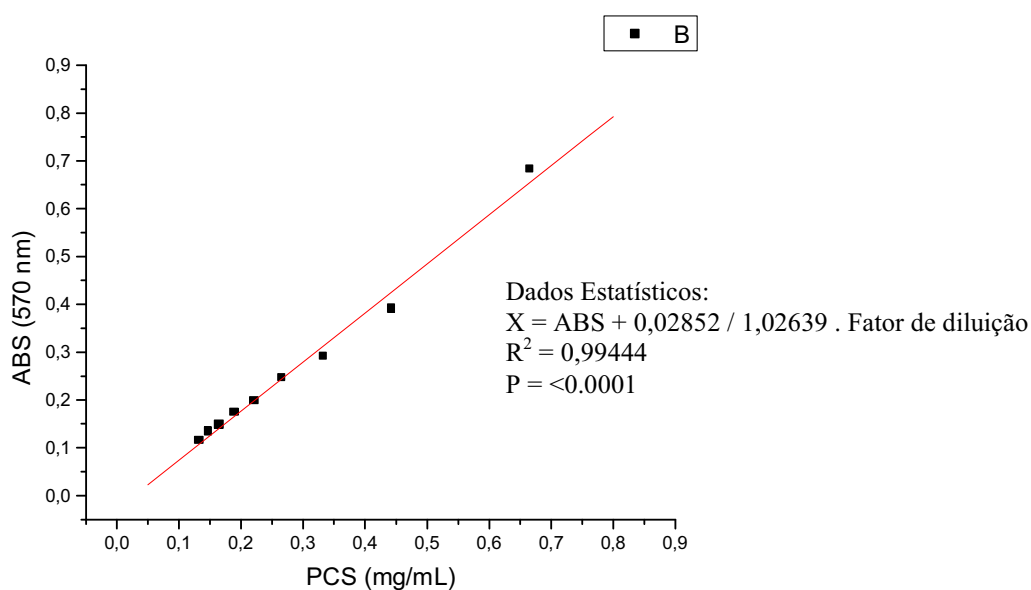


Gráfico 1 - Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.

Tabela 5 - Valores de absorvância a 540 nm amostras contendo diferentes concentrações de frutose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi-Nelson.

Concentração de Frutose (mg/mL)	ABS (540 nm)
0,02	0,085
0,04	0,183
0,08	0,468
0,1	0,545
0,12	0,682
0,16	0,917

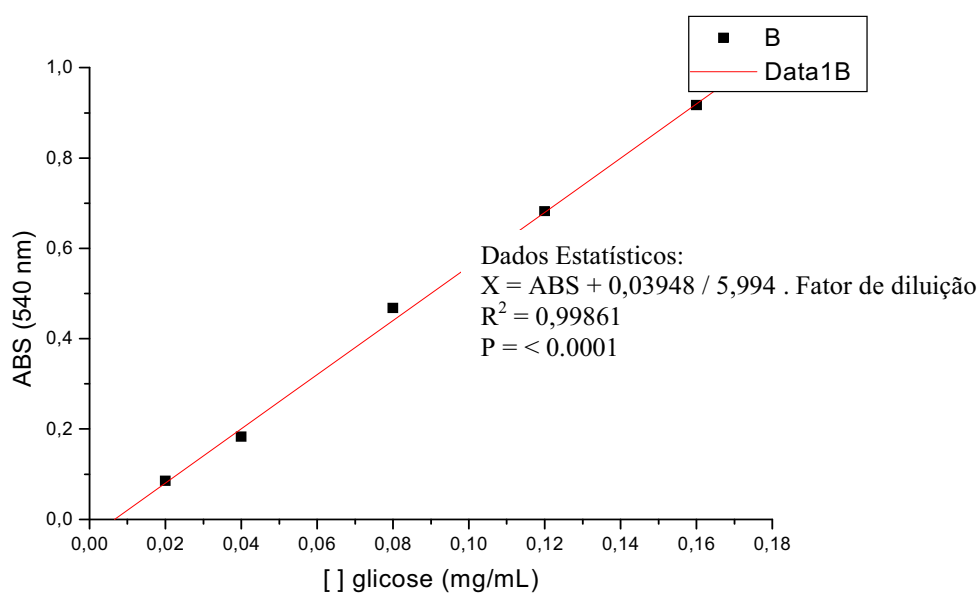


Gráfico 2 - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (g/L) pelo método Somogyi-Nelson.

Tabela 6 - Valores de absorvância a 490 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Dubois et al (1956).

Concentração de Glicose (mg/mL)	ABS (490 nm)
0,2	0,132
0,4	0,268
0,6	0,421
0,8	0,570
0,9	0,65
1,0	0,762

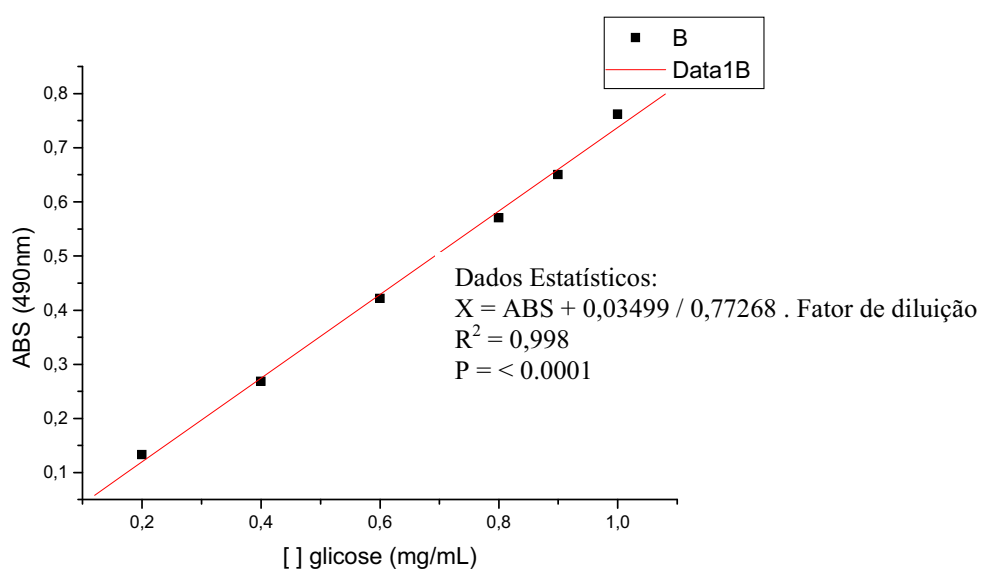


Gráfico 3 - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois et al (1956).

Tabela 7 - Valores de absorbância a 540 nm amostras contendo diferentes concentrações de frutose (umol/ml) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi-Nelson.

Concentração de Frutose (umol/mL)	ABS (540 nm)
0,111	0,092
0,222	0,195
0,445	0,408
0,556	0,528
0,667	0,637
0,889	0,829
1,111	1,007

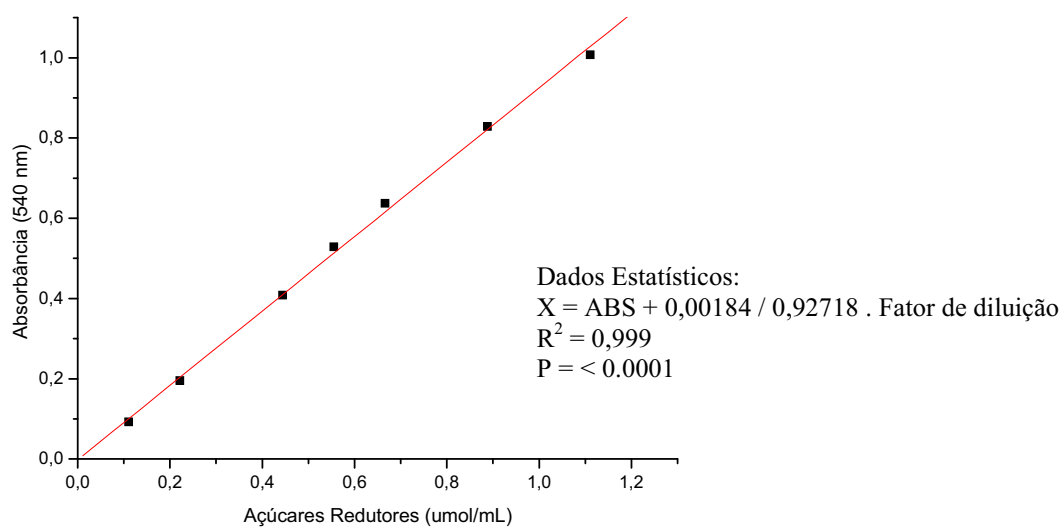


Gráfico 4 - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (umol/ml) pelo método Somogyi-Nelson.

Tabela 8 - Valores de absorbância a 500 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (umol/ml) para a confecção da curva de calibração pelo método Glicose-Oxidase- Peroxidase.

Concentração de Glicose (umol/mL)	ABS (500nm)
0,000	0,049
0,022	0,108
0,045	0,207
0,068	0,306
0,090	0,410
0,113	0,493
0,135	0,567
0,158	0,719
0,180	0,794
0,203	0,911
0,225	0,987

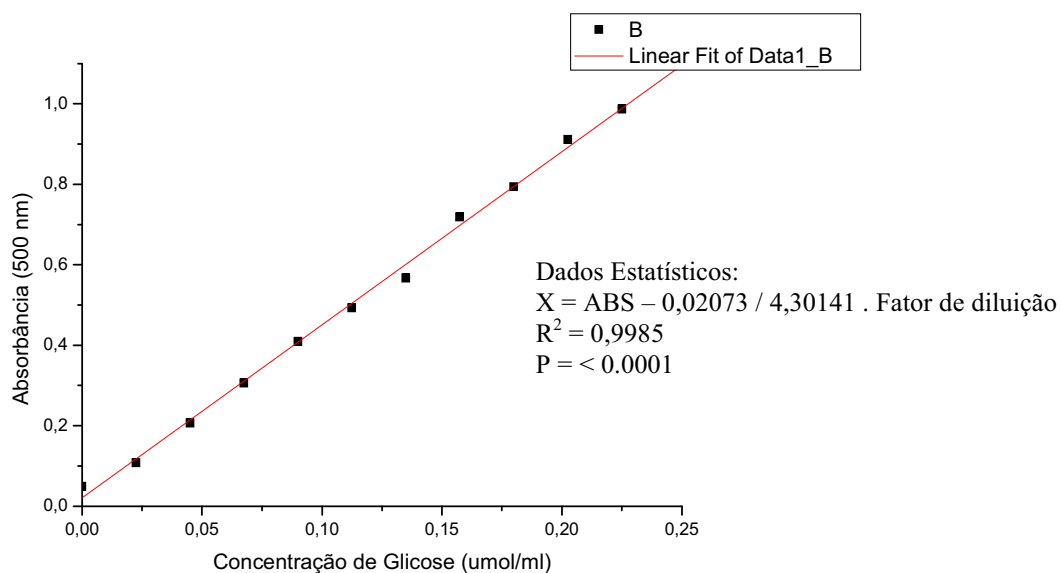


Gráfico 5 - Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (umol/ml) pelo método Glicose-Oxidase-Peroxidase.