

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASACARASE POR *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B

MARIANA CORTEZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2004

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASACARASE POR *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B

MARIANA CORTEZI

Orientador: Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2004

*Dedico as pessoas que fazem
minha vida ter um sentido
especial: Mãe, Dé, Lê, Lú, Vagner,
Celo, Paty, Matheuzinho e
Henriquinho!
Amo Vocês!!!!*

Agradecimentos....

À Deus (por tudo o que tens feito, por tudo o que vais fazer, por tuas promessas e tudo o que és, eu quero te agradecer com todo o meu ser.....)

A minha família, em especial à minha mãe!

Ao Ricardo, pelo apoio

Aos meus amigos do laboratório, pela amizade e ajuda, com certeza aprendi muito com cada um de vocês (Márcia, Guilherme, Gustavo, Daniel, Márcia N., Shurato, Sidharta, Maria Paula, Juliana, Bárbara).

Aos meus amigos de graduação: Dani, Carol, Evi, Lizie, Daiane e Vagner.

À todos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Rio Claro, em especial à Prof^a Sandra, Prof^o Marconato, Prof^a Dejanira, Adriana, Beto, Luiz!

Saudades!!!!!!

***“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito,
para que todo o que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna”.
João (3:16)***

Agradecimento especial,

Ao Prof^o Jonas, pela orientação, dedicação e amizade.

SUMÁRIO

“Página”

LISTA DE TABELAS-----	i
LISTA DE FIGURAS-----	ii
1. RESUMO-----	1
-	3
2. ABSTRAC-----	5
-	7
3. INTRODUÇÃO-----	7
-	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	11
-	18
4.1 Microrganismos de Interesse Industrial-----	21
4.2 Fermentação e Fermentação em Batelada-----	29
-	30
4.3 Dextrana: Propriedades, uso e produção-----	30
4.4 Dextranasacarase: Propriedades e mecanismo de ação catalítica-----	30
4.5 Produção de dextranasacarase-----	30
5. OBJETIVOS-----	32
6. MATERIAS E MÉTODOS-----	33
-	34
6.1 Microrganismo-----	34
6.2 Meio de Cultura-----	35
6.3 Preparo da cultura estoque e preservação do microrganismo-----	34
6.4 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência do meio de cultura (M1-M8) na produção da enzima-----	35
-	

6.5 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com controle de pH (6.0), enfocando o efeito da temperatura (23, 25, 27,29 e 31°C) na produção da enzima-----	36
-	
6.6 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada, enfocando o efeito do pH (5,0) na produção da enzima-----	37
6.7 Quantificação de sacarose em melaço-----	
6.8 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, utilizando melaço-----	38
-	38
6.9 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH enfocando o efeito da concentração de sacarose (3%, 4%) na produção da enzima-----	39
	40
	41
6.10 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada, 3% de sacarose (M9), sem controle de pH enfocando o efeito de tween 80 na produção da enzima-----	42
	42
	43
6.11 Determinação da velocidade específica de crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Ft 045 B-----	44
6.12 Determinação do Crescimento Celular.-----	
6.13 Determinação de ART (açúcar redutor total)-----	
-	44
6.14 Determinação da Atividade Enzimática-----	
-	
6.15 Síntese de dextrana e determinação da viscosidade-----	54
6.16 Caracterização do polímero, através de infravermelho (FTIR)-----	
6.17 Determinação da massa molar do polímero sintetizado-----	
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	60
-	
7.1 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência do meio de cultura (M1-M8) na produção da enzima-----	61
	61
-	
7.2 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com	62

controle de pH (6.0), enfocando o efeito da temperatura (23, 25, 27,29 e 31°C) na produção da enzima-----

- 67

68

7.3 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada, 70
enfocando o efeito do pH (5,0) na produção da enzima----- 71

7.4 Estudo da produção da enzima dextranasacarase utilizando melaço 72
como fonte de carbono-----

7.4.1Quantificação de sacarose em melaço----- 74

7.5 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem 76
controle de pH, utilizando melaço-----

-

7.6 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem
controle de pH enfocando o efeito da concentração de sacarose (3%, 4%)
na produção da enzima-----

7.7 Determinação da velocidade específica de crescimento de
Leuconostoc mesenteroides Ft 045 B-----

7.8 Síntese de dextrana e determinação da viscosidade intrínseca-----

-

7.9 Caracterização da dextrana através de infravermelho-----

7.10 Determinação da massa molar do polímero sintetizado-----

8. CONCLUSÃO-----

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1A: Composição dos meios de cultura (M1-M8) utilizados nos ensaios fermentativos (g/100mL)-----	31
TABELA 1B: Composição dos meios de cultura (M9-M13) utilizados nos ensaios fermentativos (g/100mL)-----	32
TABELA 2: Influência de 8 diferentes meios de cultura na Atividade enzimática, Crescimento celular, Concentração de substrato final e pH final, utilizando <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .FT 045 B-----	45
TABELA 3: Influência da temperatura na Atividade enzimática, Crescimento celular e Concentração de substrato final <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B 512 (F)----- -----	59
TABELA 4:Concentração de melaço utilizado em relação a concentração de sacarose correspondente-----	62
TABELA 5: Efeito da concentração de melaço na atividade enzimática, e pH final, utilizando <i>Leuconostoc mesenteroides</i> FT 045 B----- -----	63
TABELA 6: Influência da concentração de melaço (97,3 g/L) na Atividade enzimática, e pH por <i>mesenteroides</i> NRRL B 512 (F)-----	65
TABELA 7: Viscosidade durante a reação de síntese da dextrana---	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Colônia de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> -----	9
FIGURA 2: Fórmula estrutural do polímero sintetizado-----	12
FIGURA 3: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por Nelly (1960)-----	21
FIGURA 4: Foto do fermentador utilizado nas fermentações em batelada -----	35
FIGURA 5: Meio de cultura M1-----	46
FIGURA 6: Meio de cultura M2-----	47
FIGURA 7: Meio de cultura M3-----	48
FIGURA 8: Meio de cultura M4-----	49
FIGURA 9: Meio de cultura M5-----	50
FIGURA 10 Meio de cultura M6-----	51
FIGURA 11: Meio de cultura M7-----	52
FIGURA 12: Meio de cultura M8-----	53
FIGURA 13: Temperatura 23°C-----	54
FIGURA 14: Temperatura 25°C-----	55
FIGURA 15: Temperatura 27°C-----	56

FIGURA 16: Temperatura 29°C-----	57
FIGURA 17: Temperatura 31°C-----	58
FIGURA 18: pH (5.0)-----	60
FIGURA 19: Meio de cultura M11-----	63
FIGURA 20: Meio de cultura M12-----	64
FIGURA 21: Meio de cultura M13-----	66
FIGURA 22: Sacarose 3%-----	67
FIGURA 23: Sacarose 4%-----	68
FIGURA 24: Sacarose 3% (Tween 80)-----	69
FIGURA 25: Espectro de absorção de FTIR do polímero sintetizado-	71
FIGURA 26: Determinação da massa molar da dextrana sintetizada--	73

1.RESUMO

A enzima Dextranasacarase (EC 2.4. 1. 5) catalisa a síntese de dextrana a partir da sacarose. Várias espécies do gênero *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* são conhecidas por sintetizar dextranasacarase extracelular sob condições apropriadas.

O polímero dextrana apresenta várias aplicações comerciais nas indústrias farmacêuticas, mais comumente utilizada como expensor do plasma sanguíneo e no tratamento de anemias, químicas e de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção da enzima dextranasacarase por uma nova cepa de *Leuconostoc mesenteroides* (FT 045 B) isolada de Usina de Produção de Álcool e Açúcar. Diferentes composições de meio de cultura foram estudados para a produção de dextranasacarase, mostrando que o meio M5, contendo 2% m/v de K_2HPO_4 , produziu maior atividade enzimática (5,67 UDS/mL), quando comparado aos outros meios estudados. As melhores temperaturas para a produção da enzima foram 23 e 25°C, obtendo uma atividade de 3,2 UDS/mL. Fermentações utilizando melaço como fonte de carbono,

mostraram que a concentração de 97,3 g/L resultou em 11,6 UDS/mL. Quando sacarose foi usada como fonte de carbono, as concentrações de 3 e 4% m/v resultaram em atividades enzimática próximas, 10,8 e 10,7 respectivamente. A adição de tween 80 na concentração de 5% aumentou em 6% a produção da enzima. A produção de dextrana “in vitro” pela enzima livre de células (11,5 UDS/mL) adicionada a sacarose (600g/L) mostrou um aumento da viscosidade após 24 horas de reação em (10.397,38 poise). A caracterização da dextrana através de FTIR possibilitou observar que o polímero sintetizado pela enzima de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B apresenta os mesmos grupos quando comparada com as dextranas padrões de massas molares 515.000 e 9.300 Da. A massa molar média do polímero sintetizado foi determinada utilizando um viscosímetro de Ostwald, permitindo obter um valor de aproximadamente de 647000 Da.

2. ABSTRACT

Dextranase (sucrose: 1,6- α -D-glucan 6- α -glucosyltransferase EC 2.4.1.5) is the enzyme that catalyzes the synthesis of dextran from sucrose. Several species of the genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* are known to synthesize an extracellular dextranase under appropriate conditions.

The polymer dextran has various commercial applications in the pharmaceutical area, most commonly as a blood volume expander and in the treatment of anaemia, chemistry and foods.

The goal of this work was to study a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* (FT 045 B) from a Brazilian Alcohol and Sugar Plant Industry with relation to dextranase enzyme production. Different media compositions used for dextranase production showed that media M₅ containing 2% of K₂HPO₄ produced higher enzymatic activity (5.67 U/mL) when compared to the other media. The best temperatures for enzyme production in batch fermentation were 23 and 25°C showing enzymatic activity of 3.2 U/mL. Fermentation run with molasses as a carbon source at concentration of 97.3 g/L for *L. mesenteroides* FT045B resulted in

11.6 U/mL enzymatic activity. When sucrose was used as a carbon source, concentration of 3 and 4% showed respectively 10.8 and 10.7 U/mL of dextransucrase activity. The use of Tween 80 in concentration of 5% increased the enzyme production in 6%. The dextran production “in vitro” by crude enzyme cell free (11.5 U/mL) in sucrose 600 g/L showed an increase in viscosity after 24 hours of reaction (10,394.38 poise). Dextran characterization by FTIR showed that the polymer synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B enzyme has the same groups when compared with the standard dextrans (515.000Da and 9.300Da). Mw determination of synthesized dextran by production enzyme through Ostwald viscometer showed a value of 647000 Da.

3. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos obtidos de microrganismos são uma alternativa extremamente válida em diferentes áreas industriais, já que possuem propriedades similares aos sintetizados quimicamente e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que os qualificam para o desenvolvimento de novos produtos.

A indústria de alimentos é um dos principais consumidores de polissacarídeos que são aplicados primordialmente como espessantes ou agentes de suspensão e geleificantes. Os polissacarídeos são, no entanto, importantes também por seus efeitos secundários, que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, encapsulação e formação de filmes.

Historicamente, as observações empíricas sobre gomas datam de 1813, quando se constatou que os xaropes de cana de açúcar e beterraba possuíam uma textura quase sólida, dificultando o processamento do açúcar nas fases de filtração e cristalização. Pasteur em 1861 interpretou esse fenômeno como sendo resultado de

fermentação por microrganismo. A bactéria envolvida foi identificada em 1878 como *Leuconostoc mesenteroides* e o produto em 1880 como sendo uma glucana, que recebeu o nome de dextrana. A dextrana passou, muito tempo depois, a ser o primeiro polímero produzido em escala industrial.

Até o momento, a dextrana e a xantana são praticamente os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em escala industrial, dividindo fatias importantes do mercado de gomas.

Os números atuais exatos da produção mundial de dextrana não estão disponíveis, mas em 1987 já era maior que 500t/ano e o mercado continua crescendo. A Pharmacia (Suécia), é o maior produtor mundial de dextrana e soluções de dextrana, outros produtores são: Fisons (Reino Unido), Meito (Japão), Pfeiffer & Langen e UEB Sermwerke (Alemanha) e Polfa (Polônia). Alguns produtores de dextrana clínica são: Pharmacia (EUA e Suécia), Knoll/Schiwa (Alemanha), Abbatt (EUA), Travenol (EUA), Fisons (Reino Unido) (MAUGERI, 2001).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Microrganismos de Interesse Industrial

Microrganismos que possam ter interesse industrial podem ser obtidos basicamente das seguintes formas:

- Isolamento a partir de recursos naturais;
- Compra em coleções de cultura;
- Obtenção de mutantes naturais;
- Obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais;
- Obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética.

O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais é uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens melhores produtoras de um dado insumo, além de conduzir à descoberta de novos produtos.

É importante saber que o que torna um microrganismo aplicável à indústria são algumas características básicas, tais como:

- 1) Apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;

- 2) Permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado;
- 3) Não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- 4) Apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- 5) Não ser patogênico;
- 6) Não exigir condições de processo muito complexas;
- 7) Não exigir meios de cultura dispendiosos;
- 8) Permitir a rápida liberação do produto para o meio.

A escolha adequada do microrganismo a ser empregado, assim como do meio de cultura para este microrganismo, é etapa fundamental para o sucesso de um processo fermentativo. No entanto, é sempre importante lembrar que a definição de um processo fermentativo mais adequado, assim como as preocupações com a recuperação do produto são etapas da mais alta importância (SCHMIDELL, 2001).

Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria gram positiva, cocos (Figura 1), considerada micro aerófila, sendo que alguns autores consideram que o oxigênio possivelmente afeta o crescimento da cepa (BARKER et al., 1993).

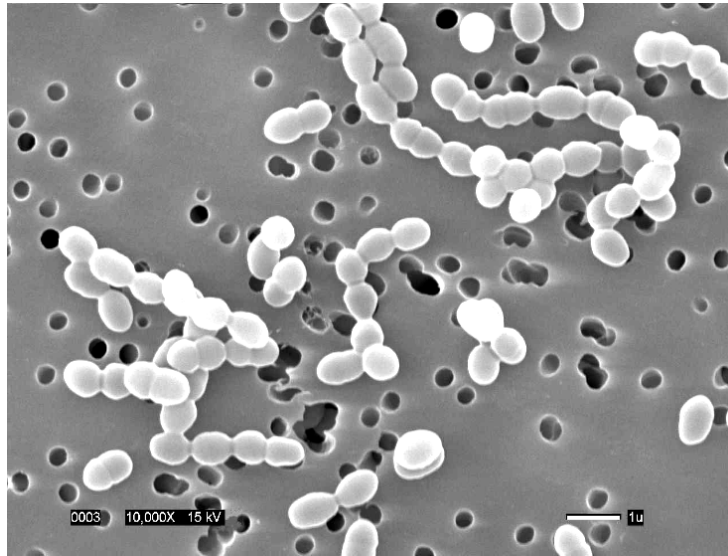


FIGURA 1: *Leuconostoc mesenteroides*

4.2. Fermentação e Fermentação em Batelada

Sob contexto industrial, é o processo microbiológico que pode ser conduzido de forma aeróbica ou anaerobicamente para transformação de um substrato em um produto de interesse (PUMPHREY e JULIEN, 1996).

As fermentações podem ser classificadas pela maneira como o substrato é adicionado e o produto retirado. Assim sendo, existem três grupos de processos fermentativos: batelada, batelada alimentada e contínua (OLIVEIRA, 2002).

Fermentação em batelada

Uma fermentação em batelada pode ser considerada um sistema fechado. No tempo $t=0$ a solução de nutrientes estéril no fermentador é inoculada com um microrganismo e incubada em condições ideais. Em todo o processo nenhum nutriente é adicionado até o final da fermentação, exceto oxigênio (no caso de um microrganismo aeróbio), um agente antiespumante e uma base ou ácido para

controle de pH. A composição do meio de cultura, geralmente a concentração da biomassa e metabólitos mudam constantemente como resultado do metabolismo das células. Após a inoculação de um microrganismo no meio a ser fermentado se observam quatro fases típicas de crescimento:

Fase 1: (Lag): é o equilíbrio físico-químico entre o microrganismo e o ambiente, após a inoculação. Nesta fase o microrganismo adapta seu sistema metabólico para aquelas condições. Nesta fase observa-se um crescimento reduzido.

Fase 2: (Fase Exponencial) : No final da fase anterior as células já se adaptaram às novas condições de cultivo. O crescimento da massa celular pode ser descrito quantitativamente como uma duplicação do número de células por unidade de tempo para bactérias e leveduras ou a duplicação de biomassa por unidade de tempo para organismos filamentosos. Embora haja a alteração do meio através da absorção de substrato e liberação de metabólitos pelas células, a taxa de crescimento permanece constante. Esta taxa de crescimento é independente da concentração de substrato.

Fase 3: (Estacionária) : Assim que o substrato for consumido ou produtos tóxicos forem liberados, o crescimento diminui ou cessa completamente. A biomassa aumenta apenas gradualmente ou permanece constante, embora a composição das células possa ser alterada. Devido à lise, novos substratos são liberados e podem servir como fontes de energia para este reduzido crescimento das células sobreviventes. Os metabólitos formados nesta fase são, geralmente, de grande interesse biotecnológico.

Fase 4: (Declínio): Nesta fase as reservas de energia das células estão esgotadas. Quando um gráfico semilogarítmico é plotado de sobrevivente versus o tempo, uma linha reta é obtida indicando que as células estão morrendo a uma taxa exponencial. Geralmente a

fermentação é interrompida no final da fase log ou quando a fase de lise celular se inicia (PUMPHREY e JULIEN, 1996).

As vantagens de se utilizar fermentação em batelada são:

- Menores riscos de contaminação (quando comparados à fermentação contínua);

- Capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se desenvolve um determinado lote de produto, o que é de grande importância para a indústria farmacêutica;

- Possibilidade de se realizar fases sucessivas no mesmo recipiente.

Assim sendo, é o mais utilizado na indústria de alimentos para a produção de iogurte, chucrute, pickles, cerveja, vinhos e outros. (CARVALHO e SATO, 2001).

4.3 Dextrana: propriedades, uso e produção.

Uma característica comum a toda dextrana é a composição química. A dextrana é um polissacarídeo formado por unidades D-glucopiranosil. Os tipos de ligações presentes variam de acordo com o microrganismo produtor. A dextrana produzida pela linhagem NRRL B-512 apresenta somente dois tipos de ligações: alfa (1,6) e alfa (1,3). O polímero é formado por uma cadeia principal com ligações alfa (1,6), com ramificações alfa (1,3). As cadeias secundárias contêm poucas unidades, sendo que 40% contêm uma, 45% duas e somente 15% contêm mais de duas unidades monoméricas. Estas cadeias ligadas à cadeia principal, através de ligações alfa (1,3), são formadas por ligações alfa (1,6), sendo constatadas algumas com até 50 unidades (SIDEBOTHAM, 1974).

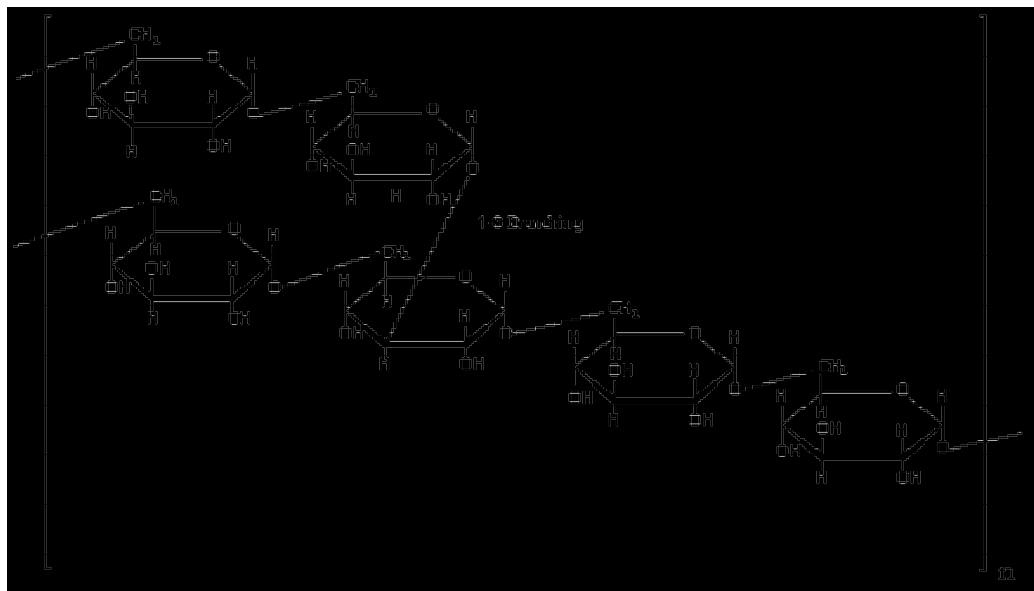


FIGURA 2: Fórmula estrutural do polímero dextrana

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

Uma característica importante na síntese de dextrana está no mecanismo de ação catalítica. A reação não envolve intermediários fosforilados, sendo que a energia para a condensação das unidades glicosídicas é fornecida pela hidrólise da ligação entre a glicose e frutose da molécula de sacarose. Este fato constitui uma diferença fundamental com o mecanismo geral de síntese dos polissacarídeos intracelulares, onde um considerável número de intermediários é utilizado. Este mecanismo envolvendo somente uma enzima, e sem intermediários, permite a síntese “in vitro” com relativa facilidade, bastando isolar a enzima colocando-se em contato com a sacarose

em condições controladas de temperatura e pH (SUTHERLAND, 1977, apud QUEIROZ, 1987).

A produção de dextrana pode ocorrer através de dois processos distintos:

Processo convencional de produção de dextrana:

Onde a dextrana é produzida durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose, extrato de levedura e outros nutrientes, controlando a temperatura, pH e a aeração.

Produção de dextrana via enzimática:

Este processo é conduzido em duas etapas: a produção da enzima e a síntese da dextrana. A síntese da dextrana “in vitro” apresenta um potencial econômico enorme, devido a algumas características da enzima: é uma enzima extracelular e para sintetizar dextrana não necessita de energia adicional e, além disso, a reação é irreversível. As vantagens desse processo são: controle de pH, temperatura e agitação; o que torna seu rendimento maior (MIBIELLE e MAUGERI, 1999).

Abaixo, destacam-se alguns usos de maior importância do polissacarídeo dextrana.

Indústria Farmacêutica:

A dextrana de baixa molar (< 75000) Da apresenta duas características importantes para os fins clínicos: é completamente metabolizada no organismo e não apresenta efeitos tóxicos ou alérgicos, os quais aparecem com a dextrana de alta massa molar ou com um alto grau de ramificação. As aplicações de maior importância comercial na indústria farmacêutica são as seguintes:

a) Expansor de plasma sanguíneo

Em solução salina isotônica a 6% m/v a dextrana de baixa massa molar apresenta propriedades coloidais, osmóticas semelhantes às proteínas do plasma. Este produto introduzido a mais de trinta anos como substituto do plasma sanguíneo nos tratamentos de choque. Dois produtos são normalmente usados, um com dextrana de massa molar média de 70 000 Da e o outro de 40 000. Uma infusão de dextrana de 70 000 Da reduz o hematócrito e deprime o fibrinogênio, além de aumentar a viscosidade e promover uma expansão volumétrica do plasma sanguíneo. A dextrana de 40 000 daltons tem um poder de expansão limitado, melhorando a fluidez do sangue e auxiliando a circulação nos vasos capilares.

b) Dextrana-Ferro

Vários carboidratos foram usados na tentativa de se produzir soluções de ferro estáveis, que pudessem ser injetadas em seres humanos. O sucesso só veio com a utilização de dextrana. O complexo formado da dextrana com íons Fe^{++} é estável e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de anemias em animais e seres humanos.

Extração de petróleo:

A dextrana é utilizada para compor a lama de perfuração e também na recuperação secundária de petróleo. Em Cuba, na década de 60, praticamente toda a dextrana produzida era destinada à extração de petróleo.

Indústria de Alimentos:

Em xaropes e doces inibe a cristalização, promovendo a homogeneização e espessamento;

Em geléias e chicletes age como agente geleificante;

Em sorvetes inibe a formação de cristais e mantém o volume. (QUEIROZ, 1987).

Indústria Química:

Sephadex foi uma substância descoberta em 1959 pelos pesquisadores suecos Bjorn Ingelman, Pet Flodin e Jerker Porath e consiste de moléculas de dextrana que podem ser ligadas em cruz para criar uma rede tridimensionnal. Esta descoberta conduziu a posteriores refinamentos na tecnologia de separação por eletroforese. Outra aplicação para o Sephadex é no “Debrisan” (1973), produto para tratamento de feridas que utiliza suas propriedades higiênicas e absorventes. Esta inovação foi introduzida por Ulf Rothman. (DADOS SOBRE A SUÉCIA, 2003).

Em 1982, um grupo de pesquisadores de Cuba elaborou um creme dental no qual o produto importado utilizado foi substituído por um produto de fabricação nacional. Nesta formulação o carboximetilcelulose de sódio foi substituído pela dextrana, que é um produto mais econômico para países açucareiros. Os autores descrevem que na bibliografia consultada há relatos de cremes dentais que apresentam dextranase na fórmula, tendo a enzima efeito hidrolizante da dextrana causadora de cárie dentária; poderia parecer ilógico incluir dextrana em uma formulação, porém este se justifica pelo fato da dextrana ser um produto elaborado sem a presença do microrganismo, que não corresponde com o crescimento microbiano que causa a cárie dental (ROMERO et al, 1982).

Este crescente interesse pela busca de novas áreas para aplicação da dextrana e seus derivados pode ser parcialmente creditada pelas características que esse homopolissacarídeo apresenta, como hidrofobicidade, estabilidade, pureza e habilidade para formar soluções claras e estáveis, além de serem derivados de

fontes renováveis e degradadas por sistemas ecológicos (DEXTRAN, 2002).

Entre os anos de 1997 e 2002, somente nos Estados Unidos foram patenteados 1041 estudos sobre dextrana e seus derivados (ROGAN, 2002). Na Europa foram registrados 1396 documentos sobres patentes de dextrana e derivados (EUROPEAN PATENT OFFICE, 2002).

Para a obtenção da dextrana clínica, tendo como maior interesse o uso farmacêutico, é feita uma redução da massa molar média da dextrana bruta (em torno de 10.000.000 Da) através da hidrólise. Estudos foram realizados para a utilização de enzimas ou ultra-som, mas industrialmente o método mais utilizado é a hidrólise ácida, por apresentar facilidade de controle e a não exigência de equipamentos sofisticados. Em uma última etapa, após o processo de redução do grau de polimerização, se faz necessário à precipitação seletiva das frações de interesse com adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos. Isto pode ser feito explorando deferentes massas molares (WOLF et al.; 1956).

Guimarães et al; (1998), estudaram a otimização de síntese e hidrólise da dextrana. No intuito de cobrir uma ampla faixa de temperaturas e concentrações de substrato, foram realizados planejamentos experimentais com temperaturas variando de 20 a 36°C e concentrações de sacarose entre 30 e 100 g/L. As reações de polimerização foram realizadas em reator de vidro encamisado, ao qual foram adicionados soluções de sacarose e de dextranasacarase, para atividade final 40UDS/mL. Verificou-se que o rendimento máximo nas reações de síntese enzimática foi de 32%, obtido a 23°C e 60 g/L de sacarose, em valores de pH inferiores a 1,0 e níveis intermediários de temperatura (80°C). Neste caso, ocorreu rápida hidrólise, com grande produtividade de dextrana clínica nas primeiras

duas horas, seguida de rápida quebra da molécula para massas molares menores. Após seis horas de hidrólise a temperatura de 75°C e pH 1,0 obteve-se os máximos rendimentos do processo, em torno de 86,5% para dextrana clínica total, 40% para dextrana 40KDa e 47% para dextrana 70KDa.

Mibielle e Maugeri (1999) estudaram a síntese in vitro de dextrana, a fim de se obter o maior rendimento possível de dextrana de elevada massa molar, para que em uma etapa seguinte, a dextrana bruta se convertesse em dextrana clínica. Os autores verificaram que na purificação da enzima dextranasacarase a atividade é bastante afetada pela adição de íons Ca^{2++} . Na produção de dextrana clínica os melhores resultados de rendimento foram obtidos utilizando na síntese enzimática uma concentração de 50g/L de sacarose e na hidrólise ácida temperatura de 76°C e pH 1,0. No processo de precipitação seletiva para a separação de dextrana clínica produzida, as concentrações de etanol utilizadas foram de 39,5% e 45,5%.

A produção de dextrana depende do pH em que se esta realizando a fermentação, esta produção é maior a pH 5,5 que a pH 6,7 ou quando o pH não é controlado. Isto pode ocorrer devido ao fato da enzima dextranasacarase ser mais ativa e estável a pH 5,5. (LAZIC et al.; 1993).

Durante a síntese enzimática da dextrana, a partir da sacarose, obtém-se a frutose, muito utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Entretanto, poucos estudos sobre a separação da frutose são encontrados, cuja recuperação traria ganhos econômicos. Com a finalidade de recuperar a frutose, a enzima dextranasacarase foi produzida por *Leuconoctoc mesenteroides* B 512F, e utilizada na síntese da dextrana. O produto direto da síntese de dextrana foi submetido a processos de separação cromatográfica em colunas de

vidro empacotadas com resina de troca iônica Dowex 50WX8 e resina Dowex XUS 40285. Foram testadas as vazões de 0,1 e 0,55 mL/min e as temperaturas de 35, 45 e 60°C. Realizou-se também a separação à 45°C em uma coluna com gel Superdex 30 num sistema HPLC. Durante a separação, amostras foram recolhidas em intervalos de tempo definidos e analisadas por cromatografia de permeação. A resina Dowex 40285 apresentou maior eficiência e as melhores condições para separação foram vazão de 0,1mL/min e temperatura de 60°C. (CAVENAGHI e FILHO, 2002).

U-Qader et al; (2001) estudaram a produção de dextrana e dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-3, utilizando como referência à cepa NRRL B 512 F. Os autores trabalharam com a temperatura de 26°C e pH 7,5, sendo que durante a fermentação o pH decrescia para 5.0. Foi observado que a cepa PCSIR-3 produziu uma dextrana diferente da produzida pela cepa NRRL B 512 F. Com 18 horas de fermentação e utilizando 2% m/v de sacarose foi alcançado 0,69 g/100mL de dextrana e crescimento celular de 0,544 g/100mL pela cepa PCSIR-3, já para a cepa NRRL B 512 F a produção de dextrana foi de 0,82 g/100mL e o crescimento celular de 0,798 g/100mL.

4.4 Dextranasacarase: Propriedades e mecanismo de ação catalítica:

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ foi estudado por um grupo de pesquisadores do México. Os autores relataram que a enzima permanece estável a 30°C, desnaturando a 40°C, e nesta temperatura mantém somente 11% da atividade original (CHELLAPANDIAN et al; 1998).

A sensibilidade da dextranasacarase quanto ao pH é bastante grande, apresentando maior estabilidade entre 5,0 e 6,0, coincidindo com a faixa de atividade enzimática máxima, sendo rapidamente desnaturada. Para preparações de enzima purificada alguns autores relatam que a faixa de estabilidade pode se alterar ligeiramente. Kobayashi e Matsuda (1980), mostram que a enzima purificada é mais estável para pHs entre 6,0 e 9,0.

Girard e Legoy (1999) estudaram a atividade e estabilidade da enzima na presença de solventes orgânicos sob várias concentrações. Os solventes utilizados foram dimetilsulfóxido, dimetilformamida, acetonitrila, etanol e acetona. A estabilidade foi medida a 4°C e 30°C. Os pesquisadores constataram que a velocidade inicial da enzima decresce proporcionalmente com a concentração do solvente, exceto em misturas água-dimetilsulfóxido, e que a enzima parece ser mais estável a 4°C que a 30°C.

Doman e Robyt (1995) estudaram algumas propriedades da enzima dextranasacarase de mutantes de *Leuconostoc mesenteroides* B 1299, onde observaram que o pH, estabilidade e temperatura de reação para cada dextrana obtida a partir da glicose ou sacarose fora similar. Houve, entretanto, uma diferença na temperatura de estabilidade entre as enzimas formuladas a partir de fontes de carbono diferentes. Dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B 1299C elaborada a partir da sacarose apresentou uma temperatura de estabilidade maior, seguida pela dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B 1299B elaborada a partir da glicose.

A atividade catalítica da dextranasacarase é uma combinação de reações envolvendo os sítios ativos da enzima, o substrato e o aceptor. Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana a partir da sacarose: a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira responsável pela quebra da ligação

entre a frutose e a glicose da sacarose, formando o grupo D – glicosil e a segunda, pela transferência do grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação.

Nelly (1960), propôs um mecanismo (Figura 2) onde a enzima teria dois sítios ativos, doador (d) e receptor (M). O crescimento do polissacarídeo se daria a partir da extremidade não redutora, envolvendo as seguintes etapas:

1) Ligação simultânea de duas moléculas de sacarose aos dois sítios ativos d e M. Neste caso, a molécula ligada ao sítio d seria doadora de resíduos D-glucopiranosil e a outra molécula receptora seria a que iniciaria a cadeia.

2) Transferência do grupo D-glucopiranosil da sacarose, ligada a outro d, para a sacarose ligada ao sítio M, com liberação de uma molécula de frutose.

3) Sucessivas transferências de grupo D-glucopiranosil do substrato para o final não redutor da cadeia em crescimento, ligado ao sítio M, com formação das ligações alfa (1,6).

4) Dissociação ou inativação do complexo enzima-dextranosil, terminando a síntese da molécula de dextrana.

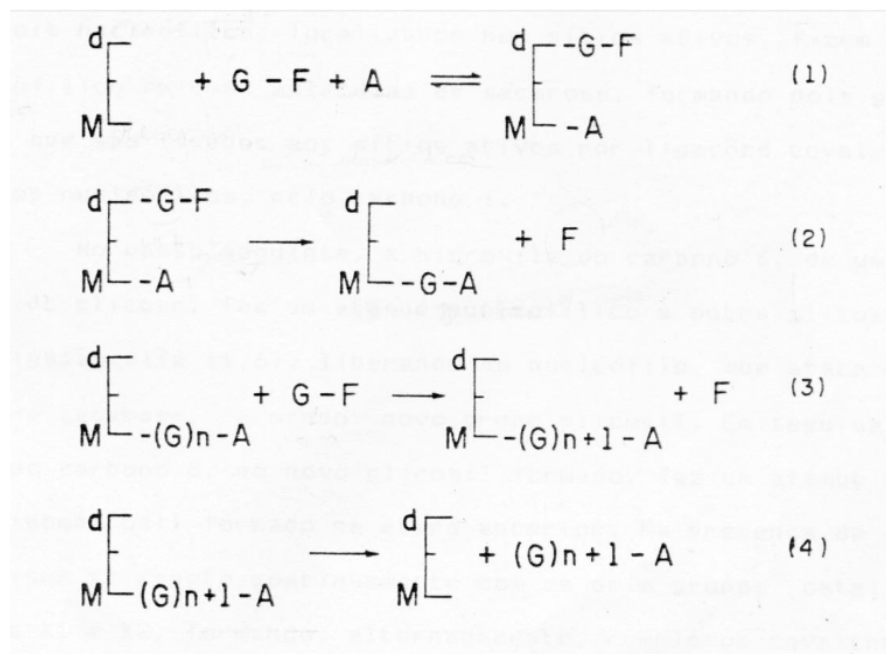


FIGURA 3: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por NELLY, (1960).

Onde:

M = Sítio ativo da enzima, receptor.

d = Sítio ativo da enzima, doador.

G-F = Sacarose doadora do monômero glicose

A = molécula de glicose iniciadora da cadeia (Aceptora)

G = Glicose

F = Frutose

4.5 Produção de Dextranasacarase:

Vários autores têm descrito os efeitos da concentração de sacarose, temperatura e extrato de levedura na produção de dextranasacarase, dextrana e frutose por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F.

Santos et al; (2000) estudaram o efeito da temperatura, pH, aeração e concentração de sacarose na produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F). O meio de cultivo era constituído de extrato de levedura na concentração de 20g/L, K_2HPO_4 na concentração de 8g/L e sacarose em concentrações variáveis. As temperaturas estudadas nas fermentações sem controle de pH e aeração, contendo 20g/L de sacarose foram 20, 25, 27,5, 30, 35 e 40°C; maior atividade foi alcançado com a temperatura de 20°C (71,7 UDS/mL). Quando estudado o efeito do pH (6,7, 5,5, 5,0 e 4,0) na produção da enzima, sob as condições de 20 g/L de sacarose e 25°C, foi verificado que a pH 5,5 a atividade foi maior (85 UDS/mL). Verificou-se que a produção da enzima aumenta com o aumento da concentração de sacarose, diminuindo para concentrações acima de 40g/L. Em concentrações acima de 80g/L houve dificuldade para determinar a atividade, pois parte da enzima e quase toda a dextrana e frutose produzida foram centrifugadas juntamente com as células.

O efeito da concentração de sacarose na produção de dextranasacarase também é mostrado por Tsuchiya et al; (1952). Esses autores constataram que concentrações maiores que 2 % m/v induzem a uma melhor produção na taxa da enzima, no entanto o meio de cultivo contém altas quantidades de dextrana, o que dificulta a remoção das células.

Lopretti et al; (1999), estudaram o efeito da taxa nitrogênio/ carbono e açúcares complementares na produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512. O meio de cultura utilizado foi sacarose (20g/L), extrato de levedura (7g/L) e Na_2HPO_4 (8g/L); nas condições de temperatura de 35°C, agitação 150rpm e pH controlado em 5.5. Verificou-se que a taxa de produção da enzima decrescia com a diminuição da concentração de

nitrogênio/carbono. A adição de pulsos de nitrogênio, quando a relação nitrogênio/carbono decrescia, permitiu uma produção constante de enzima, além de reduzir o tempo de fermentação. Lactose inibiu a produção da enzima e maltose favoreceu a síntese de dextranasacarase.

Ribeiro et al.; (1998), estudaram a produção de dextrana sacarase por fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) em diferentes formulações de meio:

Designação	Composição do meio
M1	Sacarose (40g/L), extrato de levedura (10g/L), CaCl_2 (0,05g/L), K_2HPO_4 (20g/L) e microfatores de crescimento.
M2	Melaço (40g/L)
M3	Melaço (40g/L), extrato de levedura (10g/L), CaCl_2 (0,05g/L), K_2HPO_4 (20g/L) e microfatores de crescimento.
M4	Melaço (40g/L), água de maceração de milho (10g/L), CaCl_2 (0,05g/L), K_2HPO_4 (20g/L) e microfatores de crescimento.

A temperatura usada foi 27°C, pH 6,7, aeração 0.5 vvm e agitação 250 rpm. Dentre os meios utilizados o que apresentou melhores resultados em termos de produção de enzima foi aquele contendo melaço (40g/l) em substituição a sacarose, atingindo uma atividade de 240 UDS/ml após 7 horas de fermentação.

Goyal e Katiyar (1997) estudaram o efeito de certos nutrientes na produção da enzima dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F. O pH utilizado foi de 6,9 e temperatura de 23°C. Variou-se a concentração de sacarose de 1 a 5% (m/v), observando-se que com 4% de sacarose a atividade atingiu 10

UDS/mL. O efeito da concentração de extrato de levedura e K_2HPO_4 também foi estudado, observando que 1,5% (m/v) de extrato de levedura e 2,5% (m/v) de K_2HPO_4 produziu 6,7 UDS/mL, resultado superior ao das outras concentrações estudadas. A presença de peptona e extrato de carne foi investigada, mostrando um aumento de 30% na produção quando se utilizou 1% e 2% respectivamente. A adição de tween 80, a 1%, estimulou a produção da enzima em 25%. Quando utilizado 100 μ L de $MgCl_2$ a atividade aumentou em 10%. O uso de 100 μ L de NaF favoreceu a produção da enzima, aumentando em 25% a produção.

Pirollo e Contiero (2001), estudaram a relação carbono/nitrogênio na produção da enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), trabalhando com a temperatura de 26°C, agitação 132 rpm, aeração 0,5 vvm e pH 6.7. Foi constatado que a relação carbono/nitrogênio igual a 50/20 promoveu a maior produção de biomassa e melhor atividade enzimática em 7 horas de fermentação. Concentrações de sacarose acima de 60g/L inibiu o crescimento celular e a produção da enzima.

Cortezi e Contiero (2001), estudando diferentes temperaturas (23°C, 25°C, 27°C, 29°C e 31°C) na produção de dextranasacarase utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), observaram que em pH 6,0, aeração 0,5 vvm e temperatura de 29°C favoreciam maior produção da enzima (53,52 UDS/ml) com 8 horas de fermentação; a temperatura de 31°C promoveu um decréscimo na produção da mesma, porém obteve-se nesta temperatura o maior crescimento celular (6,04 g/L). O meio de cultura utilizado foi: sacarose (40g/L), extrato de levedura (20g/L), fosfato de potássio diácido (20g/L), Cloreto de cálcio (0,2g/L), sulfato de magnésio

(0,2g/L), Cloreto de sódio (0,01g/L), sulfato ferroso (0,01g/L) e sulfato de manganês (0,01g/L).

A produção e as propriedades da dextranasacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ foi estudada por um grupo de cientistas do México. A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* foi isolada de uma bebida tradicional mexicana chamada de “pulque”, sendo que nesta bebida é possível encontrar mais de 30 gêneros microbianos, um deles *Leuconostoc mesenteroides*, possui a propriedade de tornar a bebida mais viscosa. Após os procedimentos de isolamento, o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ foi identificado. Quando incubado em 50 mL de meio de cultura contendo 20% de sacarose à 30°C, 200 rpm por 8 horas, a atividade enzimática ao final da fermentação foi de 2,4 UDS/mL. O efeito da concentração da sacarose na taxa de reação inicial também foi estudado, para isto, utilizou-se a enzima com atividade de 1UDS/mL, tampão acetato 50 mM em pH 5,4 à 30°C, mostrando que a enzima exibe um comportamento cinético do tipo Michaelis-Menten com inibição em concentrações altas de sacarose (acima de 50 g/L). (CHELLAPANDIAN et al, 1998).

Rodrigues et al; (2003) apresentaram um estudo da produção da enzima dextranasacarase a partir de *Leuconostoc mesenteroides* B 512 F em meio contendo: sacarose 50 g/L, extrato de levedura 20 g/L, K₂HPO₄ 20 g/L, NaCl 0,01 g/L, MnSO₄ 0,01 g/L, FeSO₄ 0,01 g/L, CaCl₂ 0,02 g/L, MgSO₄ 0,01 g/L. Para isto foi realizada uma fermentação semi contínua em shaker rotatório à temperatura de 27°C com repiques de 10% a cada 6 horas. Durante 24 horas foram monitorados a concentração celular, a atividade enzimática, a concentração de açúcar redutor (frutose) e o pH do meio de cultura. O ensaio foi realizado no meio de cultura citado acima e no meio enriquecido com fosfato (0,1 e 0,3 M). Dessa forma, também se

estudou a influência da concentração de fosfato na manutenção do pH do meio, crescimento celular e produção da enzima. Concluiu-se que a concentração de fosfato bibásico de 0,1 M (20g/L) não é capaz de tamponar o meio de cultura e manter o pH em valores superiores a 5,0. Notou-se que nos dois últimos repiques a queda do pH para valores inferiores a 5,0 ocorreu para intervalos de tempo menores que 3 horas após o repique; o aumento da concentração de fosfato (0,1 para 0,3M), não somente favorece a manutenção do pH, evitando assim a desnaturação da enzima, mas também favorece o crescimento celular e a produção da enzima, que é da ordem de três vezes da obtida com meio padrão (65 UDS/mL).

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

Goyal et al; (1995) realizaram um estudo com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F verificando o efeito da temperatura na produção da enzima. Os autores trabalharam com uma concentração de 2% de sacarose e extrato de levedura na mesma concentração, utilizando pH 6,9 e frascos sem agitação. A atividade enzimática a 23°C foi de 5,3 UDS/mL; maior que a obtida a 20 e 25°C que foram respectivamente 4,4 e 3,9 UDS/mL. Quando os autores utilizaram a temperatura de 23°C e frascos com agitação, a atividade foi menor (3,6 UDS/mL).

Kamal et al; (2001), realizaram um estudo comparativo da produção de dextranasacarase por *Leuconoctoc mesenteroides* 1059

e seus mutantes (a mutação foi feita através de exposição à UV). O meio de cultura utilizado foi: sacarose 2%, extrato de levedura 0,5%, K_2HPO_4 2%, NaCl 0,001 %, $MnSO_4$ 0,001 %, $FeSO_4$ 0,001 %, $CaCl_2$ 0,005%, $MgSO_4$ 0,02%, a fermentação foi realizada com um volume de 50 mL, pH inicial 7,2, 2% de inóculo, 25°C e 150 rpm. Das seis cepas expostas a UV a maior produtora foi a cepa 1059 M5, cuja atividade foi 2,96 UDS/mL, atividade esta maior que a obtida pela cepa selvagem (2,1 UDS/mL). Esta cepa foi submetida a tratamento com etil metano sulfonado (EMS) observando-se um aumento da atividade para 5,2 UDS/mL. Em seguida realizou-se um estudo comparativo entre a cepa selvagem e o mutante, variando a concentração de sacarose em porcentagem, 1%, 2% e 4%. A maior atividade foi alcançada com 4% de sacarose com 16 horas de fermentação (5,2 UDS/mL).

Barker e Ajongwen (1991) avaliaram a produção de dextranasacarase utilizando técnicas de fermentação sem aeração e com aeração. O trabalho foi realizado com a cepa NRRL B 512 (F), controle de pH em 6,7 e temperatura 23°C. Estudando taxas de aeração de 0,17; 2,0; 4,0 vvm e 0 vvm constataram que a maior atividade atingida ocorreu quando não se utilizou aeração (23,3 UDS/mL), sendo que a segunda maior atividade foi 20,1 UDS/mL utilizando-se aeração na taxa de 1L/minuto.

O efeito de diferentes tempos de agitação e taxa de aeração na produção de dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* ZDRAVLJE S-P foi estudado por Velijovic et al.; (1992). Os experimentos foram realizados em pH inicial 7,0 e temperatura 25°C. Verificou-se que a maior atividade foi alcançada utilizando uma agitação de 150 rpm e aeração de 0,05 vvm (10 UDS/mL) com 14 horas de cultivo.

Ingarano et al, (2001) avaliaram a influência da acidez e concentração de NaCl sobre os parâmetros de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides*. A cepa foi isolada a partir de embutidos cozidos alterados, o crescimento do microrganismo se realizou em caldo MRS suplementado com NaCl em diferentes concentrações (6%, 3% e 1%), e temperatura 30°C. Os resultados mostraram que um aumento na concentração de NaCl produz uma diminuição na velocidade de crescimento e um aumento na fase de latência. Os autores acreditam que isto pode ser explicado pelo aumento da pressão osmótica do meio, causado pelo aumento da concentração de NaCl e conseqüentemente, sobre a atividade de água do mesmo. Foi estudado também a influência do pH (3,5, 5,0, 7,0) no crescimento do microrganismo, sendo concluído que ocorre uma diminuição na velocidade de crescimento quando o pH abaixa de 7,0 para 5,0, além de ocorrer um aumento no tempo de latência.

5. OBJETIVOS

Estudar as condições ótimas de fermentação para a produção da enzima dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolada da produção de álcool em destilaria e a caracterização parcial do polímero sintetizado.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Microrganismo

Foram utilizados o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, isolado da produção de álcool em destilaria, cedido pela FERMENTEC S/C LTDA Assessoria em açúcar e Álcool e a cepa NRRL B 512 (F) cedida pelo Departamento de Engenharia de Alimentos –UNICAMP.

6.2 Meio de Cultivo

Foram utilizadas 13 diferentes composições de meio de cultivo para a produção da enzima dextranasacarase, como pode ser observado nas Tabelas 1A e 1B.

TABELA 1A: Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos (g/100mL).

Compo sição/ Meios de Cultivo	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Sacarose	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0
Extrato de leve- dura	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	0,5	2,0
Peptona	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5	-
K ₂ HPO ₄	0,5	-	1,5	1,5	2,0	-	1,5	-
NaCl	-	-	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
MnSO ₄	-	-	-	-	0,001	0,001	-	0,001
MgSO ₄	-	-	-	-	-	-	0,001	0,02
MnCl ₂	-	-	0,001	0,001	-	-	0,001	-
FeSO ₄	-	-	-	-	0,001	0,001	-	0,001
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	-	-	2,0
CaCl ₂	-	-	-	0,005	-	0,005	0,005	0,002

TABELA 1B: Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios fermentativos (g/100mL).

Compo sição/ Meios de Cultivo	M9	M10	M11	M12	M13
Sacarose	3,0	4,0	-	-	-
Melaço			6,3	9,7	13,6
Extrato de leve- dura	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
Peptona	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
NaCl	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
MnSO ₄	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
MgSO ₄	0,002	0,002	-	-	-
MnCl ₂	-	-	-	-	-
FeSO ₄	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-
CaCl ₂	0,001	0,001	-	-	-

6.3 Preparo da cultura estoque e preservação do microrganismo

O meio de cultivo utilizado para o preparo da cultura estoque foi o meio M8 (Tabela 1A). O cultivo foi interrompido com 8 horas de incubação, quando foram retiradas alíquotas para conservação. Esta foi realizada misturando-se 2 mL da suspensão da cultura com 2 mL de solução de glicerol 20% (v/v) e mantidas em frizer à - 20 C°.

6.4 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência de 8 diferentes meios de cultura (M1-M8) na produção da enzima.

Condições de cultivo: 30°C, 132 rpm, pH 7.4 e 0,5 vvm e volume de meio de 1 litro.

6.4.1 Preparo do pré inóculo

Foram preparados 100 mL de pré inóculo para todas as fermentações. A sacarose foi esterilizada separadamente dos demais, e o pH ajustado para 7,4. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, 40 mL da solução de sacarose foi adicionada aos outros 50 mL de meio totalizando 90 mL. O meio foi inoculado com 10mL (10%) de cultura estoque. Após inoculação foi incubada a 26°C, agitação 100 rpm por 14 horas.

6.4.2 Preparo do meio de cultivo

Foram preparados 900 mL de meio de cultivo para todas as fermentações. A sacarose foi esterilizada separadamente, o pH foi ajustado para 7.4. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C por 25 minutos. Após resfriamento 400 mL da solução de sacarose contidas em um erlenmeyer de 1000 mL foi adicionada a 500 mL de meio de cultivo contidos no reator, totalizando assim 900 mL . O meio então foi inoculado com 100 mL de pré inóculo (descrito acima). As fermentações foram realizadas durante 14 horas sob as condições de 30°C, agitação 132 rpm, aeração 0,5 vvm e pH inicial 7,4.

O volume total de trabalho no reator foi de 2 litros, sendo o mesmo equipado com sistema de controle de aeração, temperatura e agitação.

6.5 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com controle de pH (6,0), enfocando o efeito da temperatura (23, 25, 27, 29 e 31°C) na produção da enzima.

Condições de cultivo: 132 rpm e 0,5 vvm, pH 6,0 e volume de meio de 2 litros.

6.5.1 Preparo de pré inóculo

Para todas as fermentações foi utilizado o meio de cultivo M5 (Tabela 1A), o qual forneceu maior atividade enzimática.

Foram preparados 100 mL de pré inóculo para todas as fermentações. A sacarose foi esterilizada separadamente dos demais, e o pH ajustado para 6,0. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, 40 mL da solução de sacarose foi adicionada aos outros 50 mL de meio totalizando 90 mL. O meio foi inoculado com 10mL (10%) de cultura estoque. Após inoculação foi incubada a 26°C, agitação 100 rpm por 14 horas.

6.5.2 Preparo de meio de cultivo

Foram preparados 1900 mL de meio (M5) de cultura para todas as fermentações.

A sacarose foi esterilizada separadamente, o pH foi ajustado para 6,0. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C por 25 minutos. Após resfriamento 400 mL da solução de sacarose contidas em um erlenmeyer de 1000 mL foi adicionada a 1500 mL de meio de cultivo contidos no reator, totalizando assim 1900 mL. O meio então foi inoculado com 100 mL de pré inóculo (descrito acima). A fermentação foi realizada durante 8 horas.

O reator utilizado possui um volume total de 5 L, equipado com: sistema de controle de agitação, temperatura, aeração e pH (Figura 4).

O controle de pH (6,0) foi realizado utilizando NaOH 2 M.

6.6 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com controle de pH , enfocando a influência do pH (5,0) na produção da enzima.

Condições de cultivo: 30°C, 132 rpm, 0,5 vvm e volume de meio de 2 litros.

A metodologia para preparo do pré inóculo e meio de cultivo foi idêntico ao descrito no item 6.5.

A fermentação foi realizada durante 8 horas.

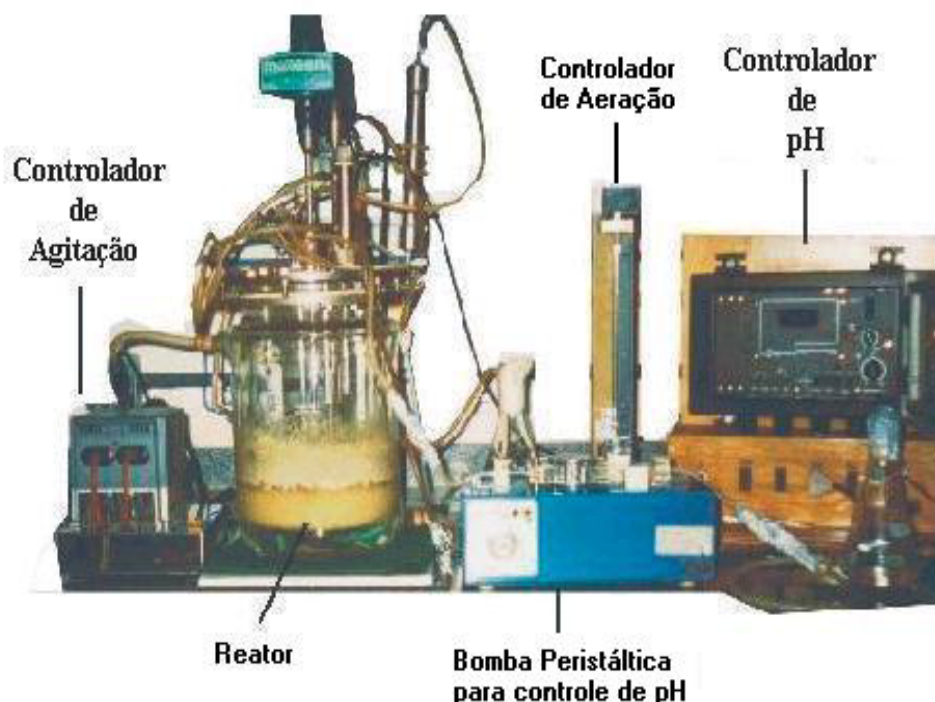


FIGURA 4: Foto do fermentador utilizado nas fermentações em batelada: equipado com: sistema de controle de agitação, aeração, temperatura e controle de pH.

6.7 Quantificação de sacarose em melaço

O melaço apresenta uma composição bastante complexa, contendo além da sacarose uma grande quantidade de açúcares redutores e um teor relativamente alto de sais, portanto, antes de iniciar os experimentos, calculou-se a quantidade de melaço necessária a fim de alcançar a concentração desejada de sacarose. Para isso, 1g de melaço foi pesado e diluído em 100 mL de água destilada. Esta solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, do sobrenadante foi retirado 1mL e diluído em 3 mL de água destilada. Após esta etapa, seguiu-se o procedimento para a determinação de ART e AR.

6.8 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, utilizando melaço.

Condições de cultivo: 25°C, 132 rpm, pH 7.4 e 0,5 vvm (30L/h) e volume de meio de 1 litro.

6.8.1 Preparo do pré inóculo

Foram preparados 100 mL de pré inóculo para todas as fermentações. O melaço foi diluído em 50mL de água destilada e centrifugado, os demais componentes foram diluídos em 40 mL de água destilada, o pH ajustado para 7,4 e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, 50 mL da solução de melaço foi adicionada aos outros 40 mL de meio totalizando 90 mL. O meio foi inoculado com 10mL (10%) de cultura estoque. Após inoculação foi incubada a 26°C, agitação 100 rpm por 14 horas.

6.8.2 Preparo de meio de cultivo

Foram preparados 900 mL de meio de cultura para todas as fermentações. O melaço foi diluído em 500 mL de água destilada e centrifugado, os demais reagentes do meio foram diluídos em 400 mL, o pH foi ajustado para 7,4, e autoclavado a 121°C por 25 minutos. Após resfriamento 500 mL da solução de melaço contidas em um erlenmeyer de 1000 mL foi adicionada a 400 mL de meio de cultura contidos no reator, totalizando assim 900 mL . O meio então foi inoculado com 100 mL de pré inóculo (descrito acima). As fermentações foram realizadas durante 14 horas.

6.9 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH enfocando o efeito da concentração de sacarose (M9, M10) na produção da enzima.

Condições de cultivo: 25°C, 132 rpm, pH 7.4 e 0,15 vvm e volume de meio de 1 litro.

6.9.1 Preparo de pré inóculo

Foram preparados 100 mL de pré inóculo para todas as fermentações. A sacarose foi diluído em 50mL de água destilada e esterilizado separadamente dos 40 mL contendo os demais componentes após o pH foi ajustado para 7.4. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, 50 mL da solução de sacarose foi adicionada aos outros 40 mL de meio totalizando 90 mL. O meio foi inoculado com 10mL (10%) de cultura estoque. Após inoculação foi incubada a 26°C, agitação 100 rpm por 14 horas.

6.9.2 Preparo de meio de cultivo

Foram preparados 900 mL de meio de cultura para todas as fermentações. A sacarose foi diluído em 500 mL de água e foi esterilizado separadamente dos 400 mL restantes, o pH foi ajustado para 7.4. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C por 25 minutos. Após resfriamento 400 mL da solução de sacarose contidas em um erlenmeyer de 1000 mL foi adicionada a 500 mL de meio de cultura contidos no reator, totalizando assim 900 mL. O meio foi inoculado com 100 mL de pré inóculo (descrito acima). As fermentações foram realizadas durante 12 horas.

O reator utilizado possui um volume total de trabalho de 2 litros, equipado com sistema de aeração, temperatura e agitação.

6.10 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada, 3% (m/v) de sacarose, sem controle de pH enfocando o efeito de tween 80 na produção da enzima.

Condições de cultivo: 25°C, 132 rpm, pH 7,4 e 0,15 vvm e volume de meio de 1 litro.

A metodologia para preparo do pré inóculo e meio de cultura foi idêntico ao descrito no item 6.9.1 e 6.9.2, porém com adição de tween 80 na concentração de 5% (v/v).

A fermentação foi realizada durante 10 horas.

6.11 Determinação da velocidade específica de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ), realizou-se uma fermentação em batelada, onde foi preparado 700 mL de meio de cultivo M9 (Tabela 1B). O cultivo foi realizado em duplicata, utilizou-se 14 erlenmeyer contendo

50 mL de meio (45 ml somados a 5 mL do inóculo). A fermentação foi conduzida sob temperatura de 25°C, sem controle de pH, 100 rpm. As amostras foram retiradas a cada 2 horas, durante 14 horas e fazia-se a leitura de DO a 650 nm.

Fez-se uma curva da biomassa (mg) em função do tempo de incubação e após linearização (L_n da biomassa versus tempo) da mesma obteve-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) nas condições do ensaio.

6.12 Determinação do Crescimento Celular.

A concentração de células no meio de cultivo foi determinada por meio da leitura em espectrofotômetro a 650 nm. A relação da densidade ótica (DO) com a massa celular foi determinada com a construção de uma curva padrão DO versus massa seca. Foram preparados 45 mL de meio de cultivo e este foi inoculado com 5 mL de cultura estoque. Amostras de 20 mL desta cultura com 8 horas de incubação foram retiradas e centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi novamente descartado. A seguir, as células foram ressuspensas em aproximadamente 2 mL de água destilada e colocada em forminhas de alumínio previamente tarada e, em seguida levadas á estufa 90 C° para secagem “over night”. Após, as forminhas foram pesadas para a obtenção da biomassa.

Para se obter a curva de biomassa versus absorbância, 20 mL desta cultura de 8 horas foi centrifugada seguindo-se os mesmos procedimentos citados anteriormente. Em seguida, as células foram ressuspensas em 20 mL de água destilada . Para a leitura da absorbância ($\lambda = 650\text{nm}$) a suspensão de células foi diluída 10, 20, 30, 40, 50 e 60 vezes.

Durante o decorrer da fermentação, foram retiradas alíquotas de 10 mL da cultura, a cada 2 horas (para as fermentações realizadas em reator sem controle de pH) e a cada 1 hora (para as fermentações realizadas com controle de pH) e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm para a determinação do crescimento celular. O sobrenadante foi guardado para posterior análise da atividade enzimática e ART (açúcar redutor total) após o pH ter sido ajustado para 5,2 com ácido ortofosfórico. As células foram lavadas novamente com 10 mL de água destilada e centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas ao volume inicial (10 mL) com água destilada e agitados em um agitador de tubos.

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

6.13 Determinação de ART (açúcar redutor total)

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

Para realização do método, adicionou-se 1,0 mL da amostra convenientemente diluída, 1,0 mL de ácido clorídrico 2 M, em seguida levou-se ao “banho-maria” a 100 C° por 5 minutos. Resfriou-se imediatamente em banho de gelo (0 C°), adicionando-se 1 mL de hidróxido de sódio 2 M. Após neutralização, retirou-se 0,25mL e adicionou-se 0,25 mL de DNS, levando-se ao “banho-maria” por 5 minutos e posteriormente banho de gelo, adicionou-se 5 mL de água destilada e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração que vai desde amarelo claro à marrom escuro; proporcional á concentração de

açúcares redutores contidos na amostra. Quanto maior a concentração de açúcares redutores, mais intensa é a coloração marrom.

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

6.14 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática da dextranasacarase foi determinada através do método de Suzuki (1988).

A reação se processou em um reator de vidro de 25 mL de volume em condições controladas: temperatura 30 C° e agitado por um agitador magnético. Dentro deste reator, colocou-se 1,0 mL da solução enzimática, 6,75 mL de água destilada, 2,0 mL de solução sacarose 51,34 g/L, 0,25 mL de tampão acetato 20 mM com 1,0 mM de cloreto de cálcio, totalizando 10,0 mL de solução.

Foram retirados 0,25 mL de 10 em 10 minutos durante 1 hora. A cada amostra foi adicionado 0,25 mL de DNS, levando-se em “banho-maria” por 5 minutos e resfriando-se. O volume foi ajustado para 3,0 mL adicionado-se para isto 2,5 mL de água pura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A determinação da atividade enzimática foi obtida através da curva Absorbância x tempo.

A unidade de dextranasacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1,0 mg de sacarose em dextrana em uma hora, liberando 0,52 mg de frutose nas condições de teste: temperatura 30 C° e pH 5,2 utilizando tampão acetato.

A fórmula utilizada para o Cálculo foi:

$\alpha_1 \times \alpha_2 \times 60/0.52 \times f \times F$ onde:

α_1 = Coeficiente angular da curva padrão da glicose

α_2 = Coeficiente angular obtido para a amostra

F = Fator de diluição para enzima

f = (Volume do reator/Volume da amostra) x Volume retirado.

6.15 Síntese de dextrana e determinação da viscosidade

A síntese da dextrana ocorreu em um reator de vidro encamisado de 380 mL de volume sob condições controladas (30°C e agitado por um agitador magnético). Neste reator foram adicionados 34 mL de solução de sacarose (600g/L), 146 mL de tampão acetato 50 mM (pH 5,2) com 1mM de CaCl₂ e 20mL da enzima com atividade de 11,5 UDS/mL. A concentração final de sacarose foi de 100g/L.

A viscosidade foi determinada no início da reação, após 8 e 24 horas , utilizando para isto um viscosímetro de Ostwald.

Após 24 horas de reação, adicionou-se 70 mL de álcool a temperatura de -20°C a fim de precipitar a dextrana. Filtrou-se a vácuo, em seguida colocou-se o filtrado em uma placa de petri, secando-se através de um secador e em seguida levou-se ao dessecador contendo CaCl₂ por 4 dias. O material já seco foi masserado até se tornar um pó fino.

6.16 Caracterização do polímero, através de infravermelho (FTIR)

Para a caracterização do polímero utilizou-se medidas de FTIR, através do emprego de pastilhas de KBr, finamente divididos. Pesaram-se 0,005g da dextrana sintetizada, 0,145 g de brometo de potássio, colocou-se em um almofariz e macerou-se até obter um pó fino. Esta amostra foi colocada em prensa (Shimadzu) por 5 minutos,

a 30 atm, e em seguida colocado em um suporte para pastilha e levado ao FTIR para análise dos grupos funcionais. Como padrão utilizou-se dextrana comercial (Sigma) de massas molares 515.000 e 9.300 Da.

6.17 Determinação da Massa Molar do polímero sintetizado.

Para determinar a massa molar da amostra sintetizada foi utilizado como referência o trabalho de Tirtaatmadja et al; (2001). Como padrão foram utilizadas três amostras de dextrana comercial da marca Sigma (9.300, 73.000 e 515.000 Da). Para cada amostra incluindo a sintetizada foram preparadas soluções nas concentrações de: 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% (m/v), verificando-se a viscosidade específica e a densidade. Os valores de viscosidade específica foram graficados contra concentração, determinando-se a viscosidade intrínseca. Esses valores foram então graficados contra massa molar e a massa molar da amostra sintetizada determinada.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, enfocando a influência de 8 diferentes meios (M1-M8) de cultivo na produção da enzima.

Como pode ser observado na Tabela 2, para todas as fermentações, exceto a realizada com o meio 8 (M8) o pH ao final das 14 horas de cultivo ficou em torno de 4,0-5,0.

Este decréscimo no pH do meio de cultivo se deve ao fato de que no decorrer da fermentação, ácido láctico além de outros subprodutos são excretados pelo microrganismo levando a esta progressiva diminuição do pH.

TABELA 2: Influência da composição de 8 diferentes meios de cultura na Atividade enzimática, Crescimento celular, Concentração de Substrato final e pH final, utilizando *Leuconostoc mesenteroides*.FT 045 B

Condições de Cultivo: 30C, 132 rpm, 0,5 vvm, pH 7,4, 10% inóculo em 14 horas de fermentação.

Composição/ Meio de Cultura	Atividade enzimática máxima (UDS/mL)	Crescimento Celular máximo (mg/mL)	Concentração de Substrato final (g/L)	pH final
M1	0,96	0,70	3,30	4.61
M2	1,70	0,34	8,50	5,00
M3	4,00	1,43	0,23	4.20
M4	5,40	1,43	0,60	4.70
M5	5,67	1,14	0,80	4.40
M6	1,98	1,14	2,41	4.10
M7	4,18	1,47	0,17	4.48
M8	1,85	0,32	24,5	6.80

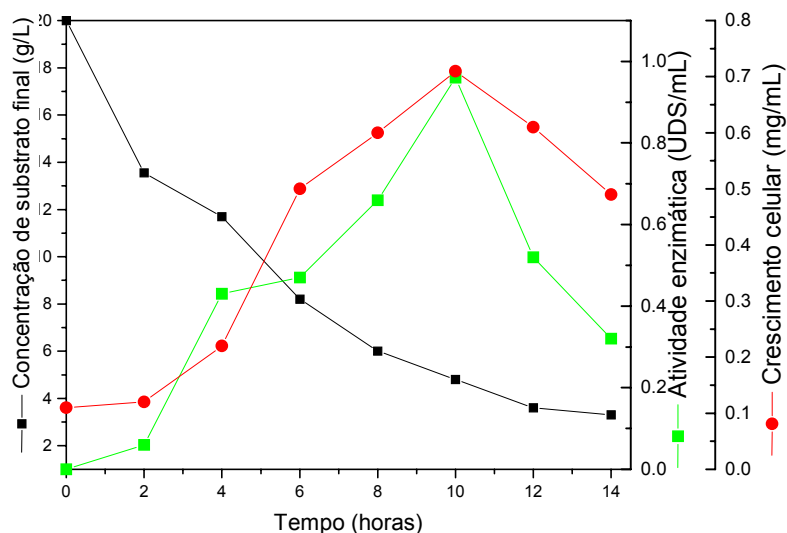


FIGURA 5: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B em meio de cultivo M1, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm.

Observando-se a Figura 5, a maior atividade enzimática ocorreu com 10 horas de cultivo, mesmo tempo em que ocorreu o máximo crescimento celular, apresentando em seguida uma queda na produção de ambos. Dentre todos os meios estudados, na fermentação realizada com o meio M1 obteve-se menor produção de enzima, podendo ter sido ocasionado pela ausência de oligoelementos na composição do mesmo, que apesar de serem requeridos em menor quantidade pelo microrganismo são importantes para o crescimento celular do mesmo.

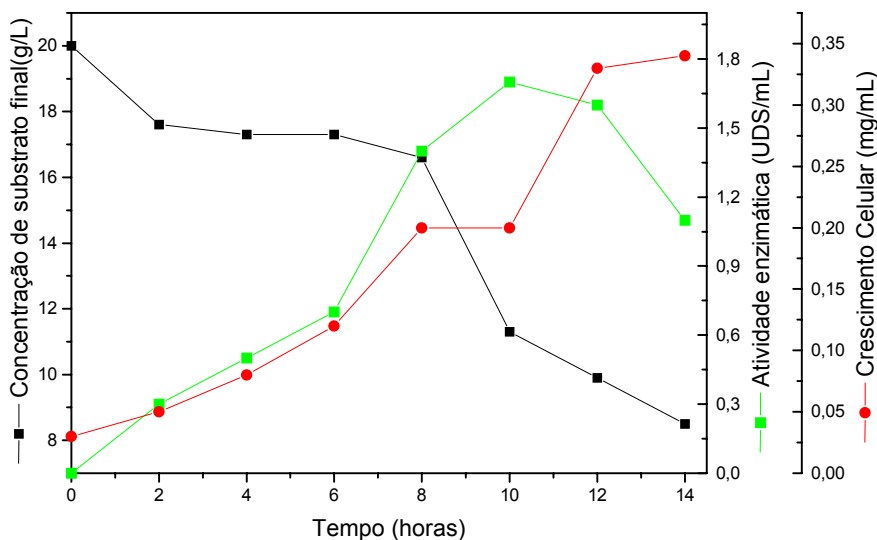


FIGURA 6: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M2, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm.

Na Figura 6, constata-se que um máximo de atividade enzimática ocorreu com 10 horas de fermentação (1,7 UDS/mL), já o crescimento celular atingiu seu pico com 12 horas de cultivo (0,34 g/L).

A Figura 7 mostra que na fermentação realizada com o meio M3 além de ocorrer uma diminuição no tempo de produção da enzima, ocorreu também um aumento na produção da mesma, atingindo 4,0 UDS/mL com 6 horas de cultivo, por outro lado, o pico de crescimento celular ocorreu com 10 horas de fermentação (1,43 g/L). Este aumento da produção da enzima pode ter sido favorecido pela presença do K_2HPO_4 em maior concentração e também dos elementos NaCl e $CaCl_2$. UI-Quader et al (2001) trabalhando com o mesmo meio de cultura, obteve uma atividade enzimática superior

(10,32 UDS/mL), porém utilizando a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), que é a cepa utilizada industrialmente.

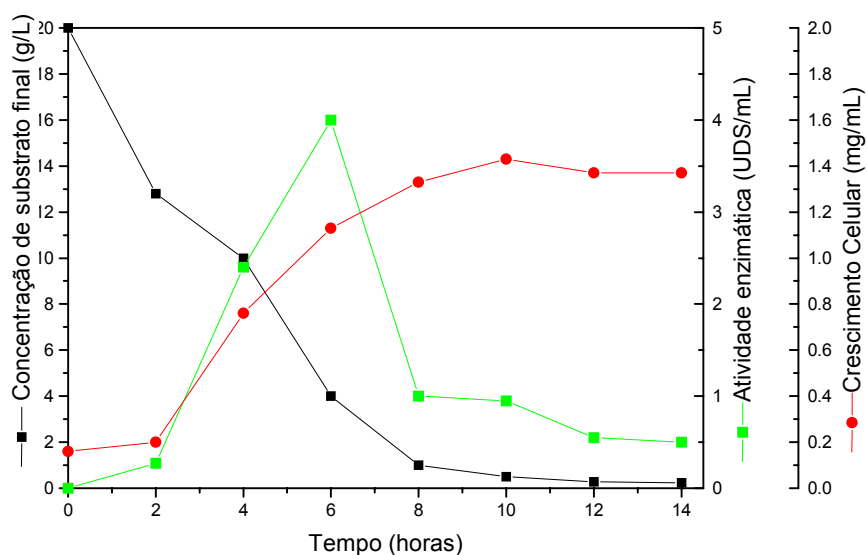


FIGURA 7: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M3, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

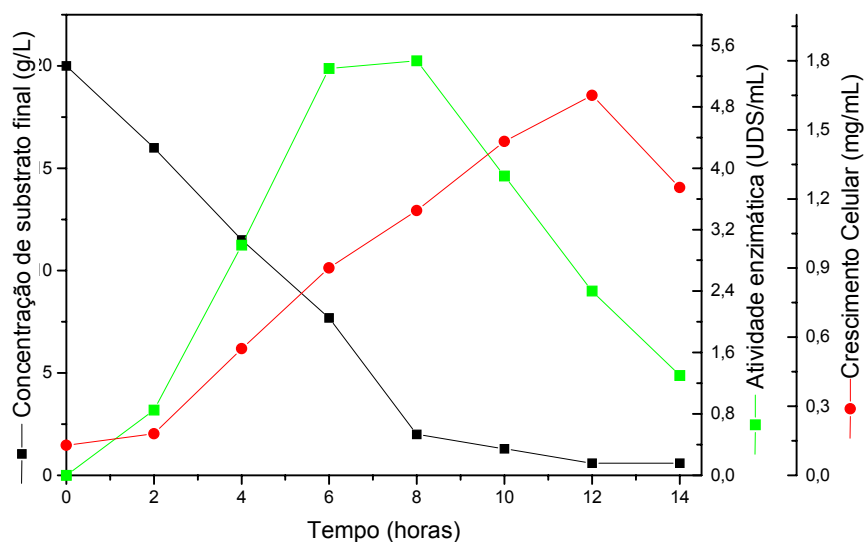


FIGURA 8: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M4, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

Observando-se a Figura 8, constata-se maior atividade enzimática em 8 horas de cultivo, atingindo uma atividade de 5,4 UDS/mL. A adição de CaCl_2 na concentração de 0,005 g/100mL pode ter favorecido esta produção já que o CaCl_2 confere maior estabilidade para a enzima. Resultado similar foi observado por Goyal et al (1995) onde trabalhando com a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), obtiveram uma atividade enzimática de 5,3 UDS/mL. O meio de cultura utilizado pelos autores foi similar ao M4, porém sem peptona e com acréscimo de FeSO_4 e MgSO_4 . O volume de trabalho foi 100 mL, sem aeração e a temperatura utilizada foi 23°C. Valores superiores para a produção de dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* foi obtido por Santos et al.,

(1999); Lopretti et al., (1999); Mibielli e Maugeri (1999) e Barker e Ajongwen (1990).

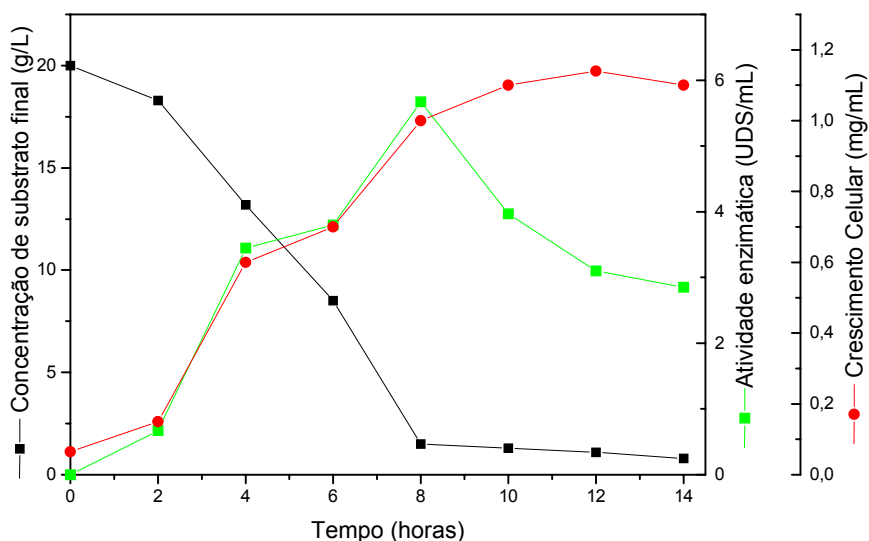


FIGURA 9: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M5, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

A maior atividade enzimática foi obtida na fermentação realizada com o meio M5 (Figura 9), sendo 5,67 UDS/mL, este meio apresentava um aumento na concentração de K_2HPO_4 de 2%. Valor inferior foi obtido por Goyal et al; (1995), os quais atingiram uma atividade de 4,4 UDS/mL utilizando a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F), sendo que os pesquisadores utilizaram uma temperatura inferior (20°C), sem aeração e um volume de meio também inferior (100mL). Valor superior de produção foi obtido por Veljkovic et al; (1992), os quais trabalharam com a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* ZDRAVLJES S-P a 25°C, pH 7,2, volume de meio 400mL, agitação 150 rpm e taxa de aeração 0,05

vvm, sendo que o meio de cultivo continha extrato de malte de cevada na concentração de 5g/L. Nestas condições a produção foi de 10 UDS/mL com 14 horas de fermentação e o pH final foi de 5,0.

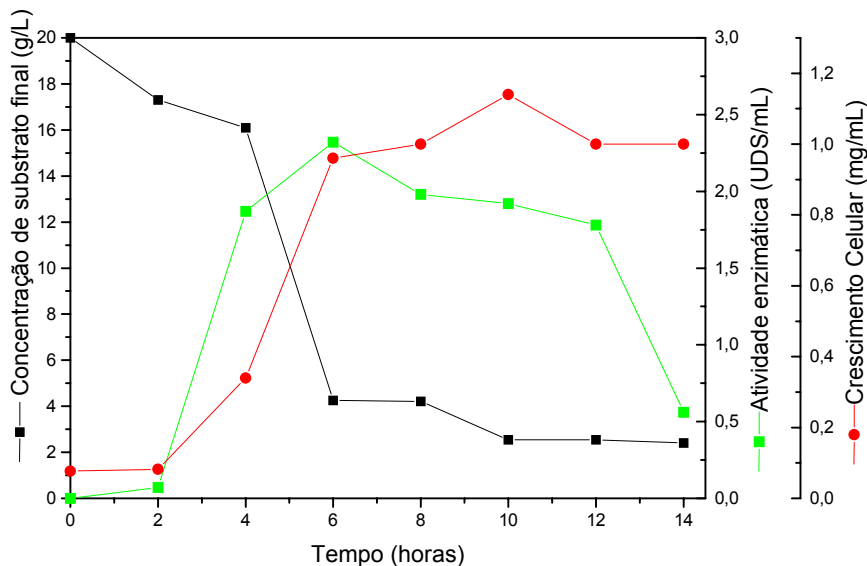


FIGURA 10: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M6, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

Pode-se observar que ocorreu uma queda na produção da enzima quando utilizado o meio M6 e M8, (Figuras 10 e 12), sendo a atividade de 2,32 e 1,85 UDS/mL respectivamente. Este fato pode ter sido ocasionado pela falta de K_2HPO_4 no meio de cultura, já que este apresenta a característica de evitar oscilações bruscas no pH do meio reacional. No caso da fermentação realizada com o meio M8 a baixa atividade alcançada pode ter sido também provocada pelo aumento da concentração de sacarose (40g/L), já que nas outras 7 fermentações a concentração de sacarose foi de 20g/L; um aumento

na concentração de açúcar no meio de cultura pode inibir o crescimento da bactéria e conseqüentemente diminui a produção da enzima.

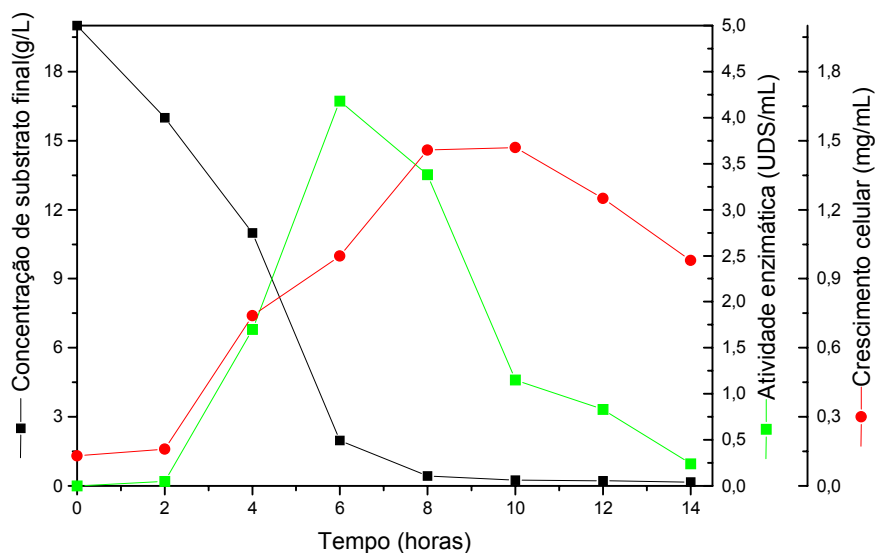


FIGURA 11: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M7, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

A Figura 11 mostra que a atividade máxima ocorreu com 6 horas de cultivo (4,18 UDS/mL). Goyal e Katiyar (1997) obtiveram uma atividade similar (4,25 UDS/mL), os mesmos autores utilizaram no meio de cultura uma concentração de 50µM de MgCl₂, além de outros oligoelementos utilizados no meio M7.

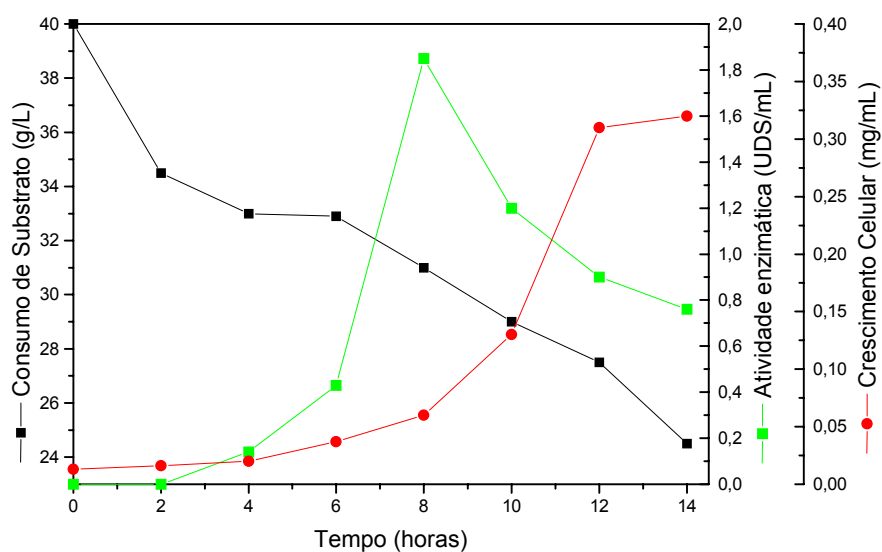


FIGURA 12: Concentração de substrato final, atividade enzimática e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B crescendo em meio de cultivo M8, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 30°C, 132 rpm, pH 7,4, 0,5 vvm

7.2 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com controle de pH, enfocando o efeito da temperatura (23, 25, 27, 29 e 31°C) na produção da enzima.

Nas Figuras 13 e 14 esta apresentado o efeito de diferentes temperaturas sobre os parâmetros analisados. O pico de atividade enzimática ocorreu com 8 horas de fermentação (3,2 UDS/mL). Porém quando utilizado o meio de cultura M5 sem controle de pH, a atividade foi maior (5,67 UDS/mL), isto pode ser devido ao fato do pico de produção da enzima dextranasacarase ocorrer com o pH por volta de 5,0, fato este constatado quando a fermentação foi realizada sem o controle de pH.

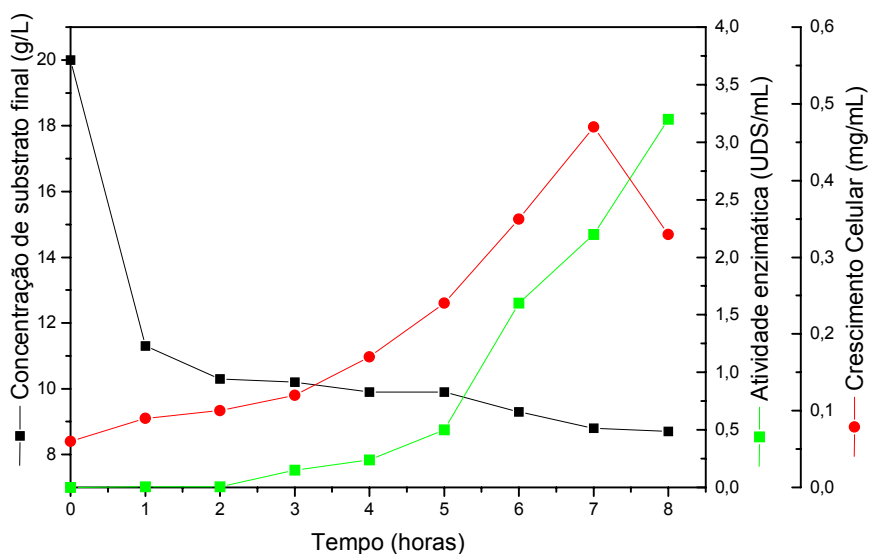


FIGURA 13: Efeito da temperatura 23°C na concentração de substrato final, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições: 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,0.

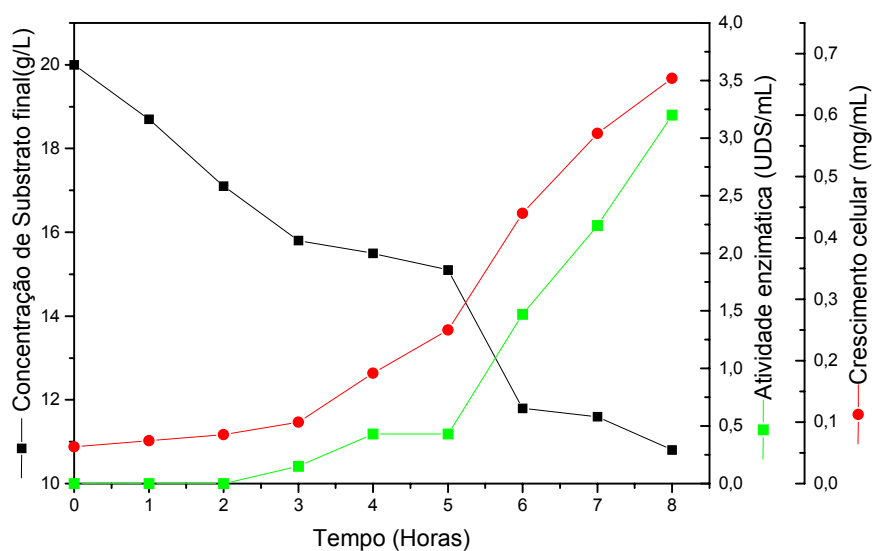


FIGURA 14: Efeito da temperatura 25°C na concentração de substrato final, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições: 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,0.

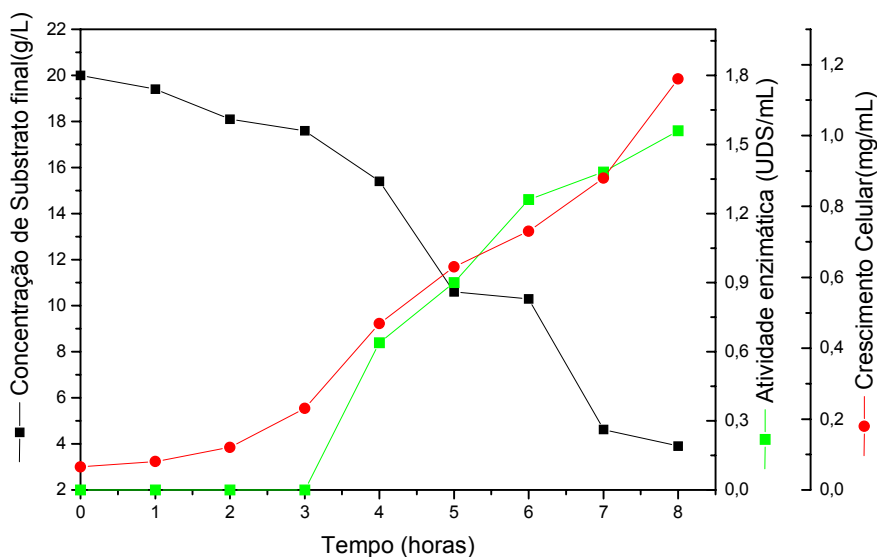


FIGURA 15: Efeito da temperatura 27°C na concentração de substrato final, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições: 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,0.

A produção da enzima dextranasacarase diminuiu com o aumento da temperatura (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17), enquanto que o crescimento celular aumenta com a temperatura até 29°C, decrescendo quando da utilização da temperatura de 31°C (Figura 17). Valores superiores aos alcançados nas fermentações com controle de pH (6,0) foram obtidos por Dols et al; (1997), os quais realizaram as fermentações utilizando a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B 1299, sob as condições de 27°C, 200 rpm, 0,5 vvm e pH mantido em 6,7, alcançando com 8 horas (5 UDS/mL). A 23°C Goyal et al; (1955) obtiveram praticamente a mesma atividade que a obtida neste trabalho quando utilizada a temperatura de 23°C, atingindo uma atividade de 3,6 UDS/mL, porém sem controle de pH.

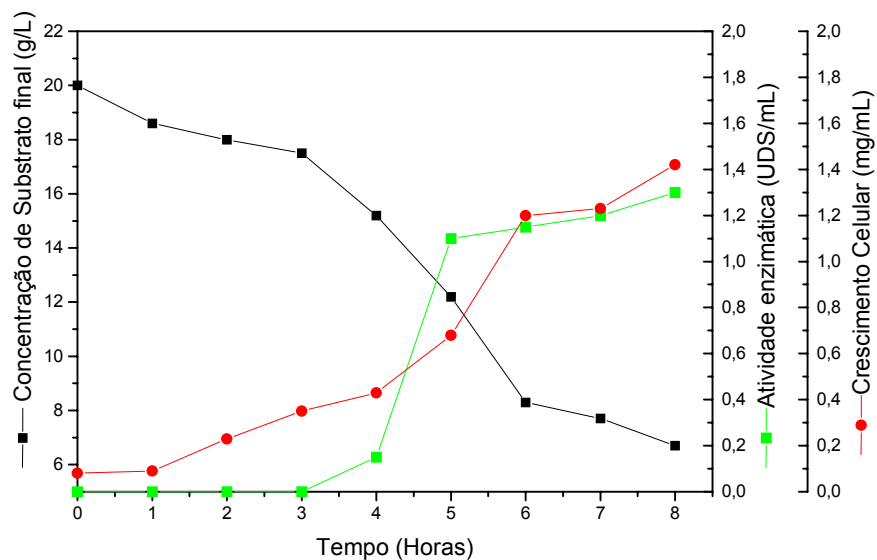


FIGURA 16: Efeito da temperatura 29°C na concentração de substrato final, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições: 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,0.

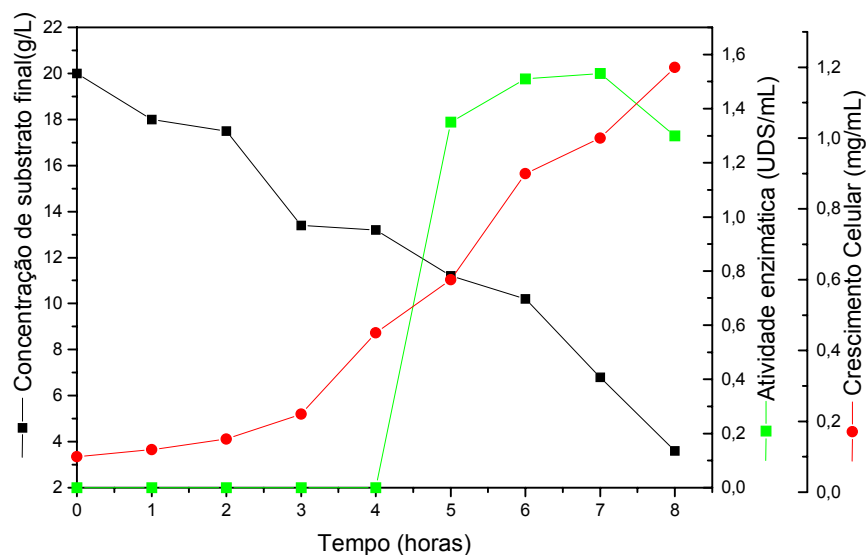


FIGURA 17: Efeito da temperatura 31°C na concentração de substrato, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições: 132 rpm, 0,5 vvm e pH 6,0.

O efeito da temperatura na produção da enzima dextranasacarase foi estudado por Cortezi e Contiero (2001), onde as condições de cultivo foram idênticas as usadas neste trabalho (132 rpm, 0,5 vvm, pH 6,0, em 8 horas de fermentação), porém foi utilizada a cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) e uma concentração de 4% (m/v) de sacarose. Os valores encontrados de atividade enzimática, crescimento celular e concentração de substrato final são mostrados na tabela 3.

TABELA 3: Influência da Temperatura na Atividade enzimática, Crescimento celular e Concentração de substrato final *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F).

Condições de Cultivo: 132 rpm, 0,5 vvm, pH 6,0, em 8 horas de fermentação.

Temperatura (°C)	Atividade enzimática máxima (UDS/mL)	Crescimento Celular máximo (g/L)	Concentração de substrato final (g/L)
23	49,31	2,14	2,00
25	37,81	4,37	0,68
27	40,48	4,38	2,13
29	53,52	4,15	2,40
31	20,30	6,04	6,53

Além da grande diferença nos valores de produção da enzima pelas duas cepas estudadas, é observado que quando utilizada a temperatura de 29°C a atividade enzimática foi a maior alcançada (53,52 UDS/mL) para a cepa NRRL B 512 (F), já para a cepa FT 045 B, esta temperatura resultou em menor produção da enzima (1,3 UDS/mL). Com o aumento da temperatura ocorreu um aumento do crescimento celular quando utilizada a cepa FT 045 B, sendo que a maior biomassa ocorreu com a temperatura de 29°C (1,42 mg/mL). Quando utilizada as temperaturas de 25, 27 e 29°C, para a cepa NRRL B 512 (F), os valores de crescimento celular foram muito próximos, sendo que a temperatura de 23°C resultou na menor biomassa (2,14 g/L) e à 31°C ocorreu o maior crescimento da cepa (6,04 g/L).

A cepa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) é usada como referência na maioria dos trabalhos, uma vez que muitos estudos foram desenvolvidos, avaliando diversos parâmetros no processo fermentativo desta cepa. A cepa FT 045 B, por ter sido isolada recentemente da produção de álcool e açúcar, pouco se conhece sobre a mesma, sendo necessário o estudo de outros parâmetros na produção da enzima e crescimento celular.

7.3 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada com controle de pH (5,0).

Considerando que nos experimentos conduzidos sem controle de pH as máximas atividades enzimáticas observadas ocorreram quando o pH estava em torno de 5.0, optou-se por realizar uma fermentação com controle de pH em 5.0, porém constatou-se que com o pH controlado neste valor, houve um efeito negativo tanto no crescimento do microrganismo, como na produção da enzima. Em algumas fermentações, o aumento da produção de dextranasacarase é proporcional ao crescimento da cepa, o pH do meio controlado em 5,0 pode ter inibido o crescimento celular, levando então a baixa produção enzimática; outro fato que pode ter ocasionado este resultado é que em meio ácido, a enzima sofreu desnaturação, impedindo seu acúmulo no meio de cultura.

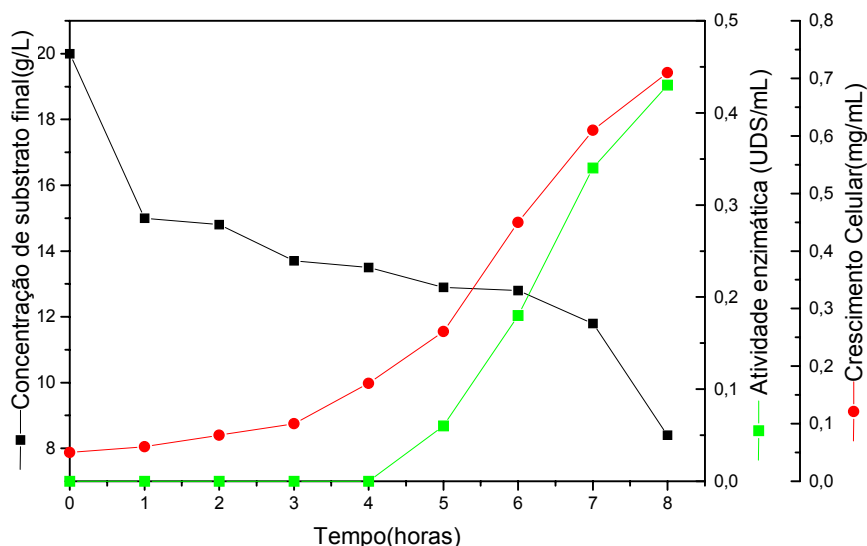


FIGURA 18: Efeito do pH (5,0) na concentração de substrato final, produção de dextranasacarase e crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, durante 8 horas de fermentação. Condições de: 132 rpm, 0,5 vvm e 30°.

7.4 Estudo da produção da enzima dextranasacarase utilizando melaço como fonte de carbono

7.4.1 Quantificação de sacarose em melaço

Conforme descrito no item 6.7, para a determinação da porcentagem de sacarose em melaço foi realizada a metodologia de açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART), os quais os valores encontrados foram 14,8% para AR e 40,5% ART, subtraiu-se esses dois valores, o valor encontrado (25,7g/L) foi a concentração de sacarose contida em 100 g de melaço. A partir disso, calculou-se a concentração pretendida de sacarose a ser utilizada. (Tabela 4).

TABELA 4: Concentração de melaço utilizado e a concentração de sacarose correspondente.

Quantidade de melaço necessária (g/L)	Concentração de sacarose (g/L)
62,3	16,0
97,3	25,0
136,0	35,0

7.5 Produção de dextranasacarase por fermentação em batelada sem controle de pH, utilizando melaço.

O interesse em se utilizar melaço como fonte de carbono deveu-se ao fato deste apresentar uma fonte alternativa de sacarose, além de ser economicamente mais barato e de fácil obtenção.

Como observado na tabela 5, a concentração de melaço tem forte influência na produção da enzima dextranasacarase, sendo que a maior atividade enzimática foi obtida quando utilizada a concentração de 9,7 g/L (M12), alcançando 11,6 UDS/mL.

O pH de ambas as fermentações foi inferior a 5,0, evidência de produção de ácido no meio de cultivo.

Outros autores fizeram uso do melaço como substituto de outros açúcares em fermentações industriais (PARK e SATO, 1982; UENO, HAMADA e URANO, 2003; ALI, OADER e IQBAL, 2002).

TABELA 5: Efeito da concentração de melaço na atividade enzimática, e pH final, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B

Condições de Cultivo: 25°C, 132 rpm, pH 7.4, 0,5 vvm (30L/h), volume de meio de 1 litro, 14 horas de fermentação.

Composição/ meio de cultura	Atividade enzimática máxima (UDS/mL)	pH final
M11	7,90	4,85
M12	11,6	4,56
M13	9,80	4,45

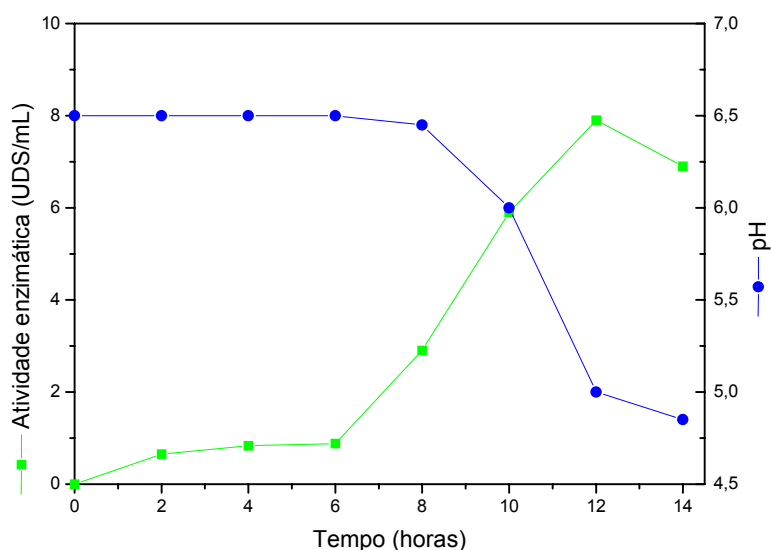


FIGURA 19: Variação da atividade enzimática e pH do meio utilizando *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, em meio de cultivo M11, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH 7.4, volume de meio de 1 litro.

Observa-se pela Figura 19 que o pH decresce com o aumento da atividade enzimática, sendo que com 10 horas de cultivo ocorreu uma queda brusca no pH passando de 6,0 para 5,0. Com 12 horas de

fermentação ocorreu o pico da produção da enzima (7,9 UDS/mL), decrescendo quando o pH atinge valor inferior a 5,0.

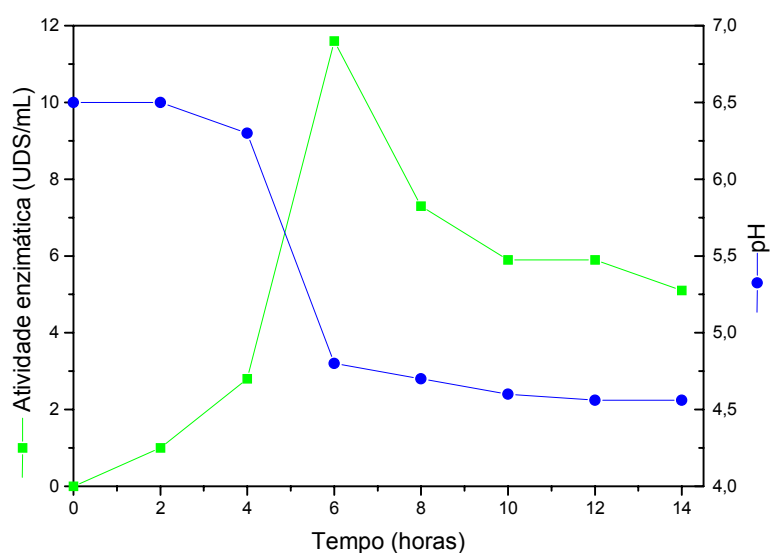


FIGURA 20: Variação da atividade enzimática e pH do meio, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, em meio de cultivo M12, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH 7.4, 0,5 vvm, volume de meio de 1 litro,

Conforme resultados apresentados na tabela 6, quando foi utilizada uma concentração maior de melaço (97,3), além de favorecer a produção da enzima, maior atividade (11,6 UDS/mL) foi alcançada em menor tempo de cultivo, ou seja, com 6 horas de fermentação. Neste tempo o pH do meio estava 4,8, conforme descrito na tabela 6, fato esse contrastado com o observado nas Figuras 20 e 21.

TABELA 6: Influência da Concentração de melaço (97,3 g/L) na Atividade enzimática, e pH por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B. Condições de Cultivo: 132 rpm, 0,5 vvm, 1 litro de meio em 14 horas de fermentação.

Tempo de fermentação	Atividade enzimática (UDS/mL)	pH
0	0	6,5
2	1,0	5,5
4	2,8	6,3
6	11,6	4,8
8	7,6	4,7
10	5,9	4,6

Ribeiro et al; (1998) verificaram em seus estudos que a substituição de sacarose por melaço na concentração de 40 g/L levou a uma maior produção da enzima dextranasacarase.

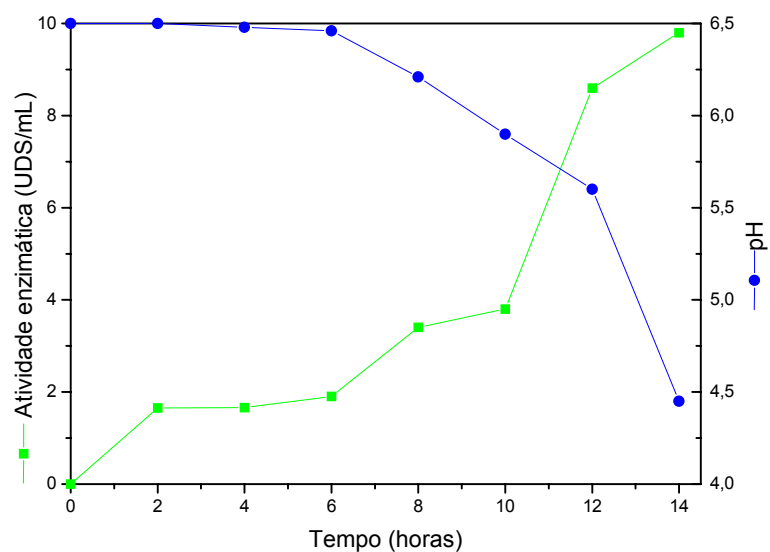


FIGURA 21: Variação da atividade enzimática e pH do meio, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, em meio de cultivo M13, durante 14 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH 7.4, 0,5 vvm, volume de meio de 1 litro,

7.6 Efeito da concentração de sacarose (3%, 4%) na atividade enzimática, crescimento celular e consumo de substrato por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B.

De acordo com os gráficos apresentados nas Figuras 22 e 23 pode-se notar que a atividade enzimática máxima foi similar para as duas concentrações de sacarose [3% (M9) e 4% (M10)], observa-se também que a máxima produção ocorreu com 6 horas para ambas as fermentações. O crescimento do microrganismo apresentou valores próximos para as duas concentrações estudadas, porém com 3% de sacarose obteve-se uma maior biomassa.

Pode-se observar que a concentração de substrato teve uma queda brusca no cultivo realizado com 3% de sacarose, já quando se utilizou 4% esta queda foi mais suave.

A concentração de sacarose apresenta um fator importante na produção da enzima e crescimento do microrganismo de interesse, autores relatam que um aumento significativo de açúcar pode influenciar negativamente no processo fermentativo, agindo então de forma inibidora. (SANTOS et al., 2000; GOYAL e KATICAR, 1997; CHELLAPANDIAN et al, 1998).

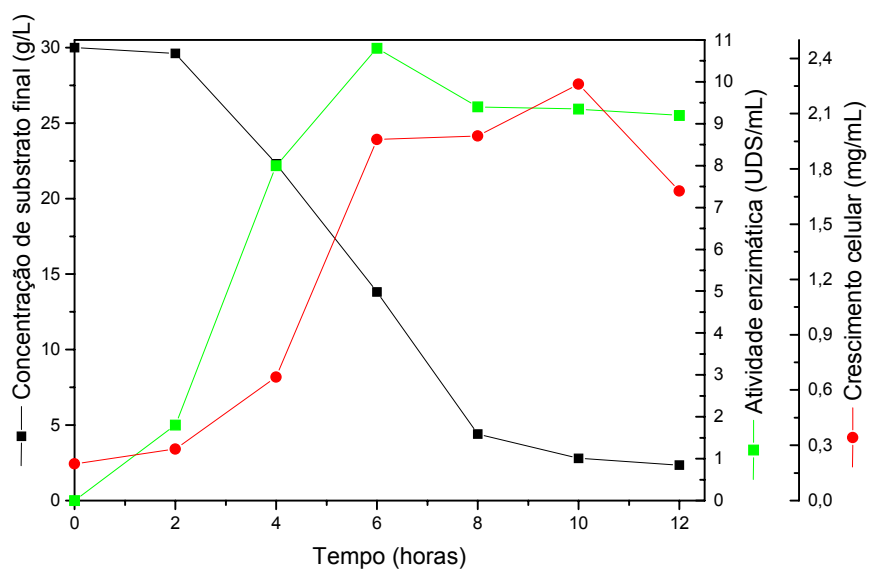


FIGURA 22: Atividade enzimática, crescimento celular e concentração de substrato final por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, em meio de cultivo M9, durante 12 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH inicial 7,4, 0,15 vvm, volume de meio de 1 litro.

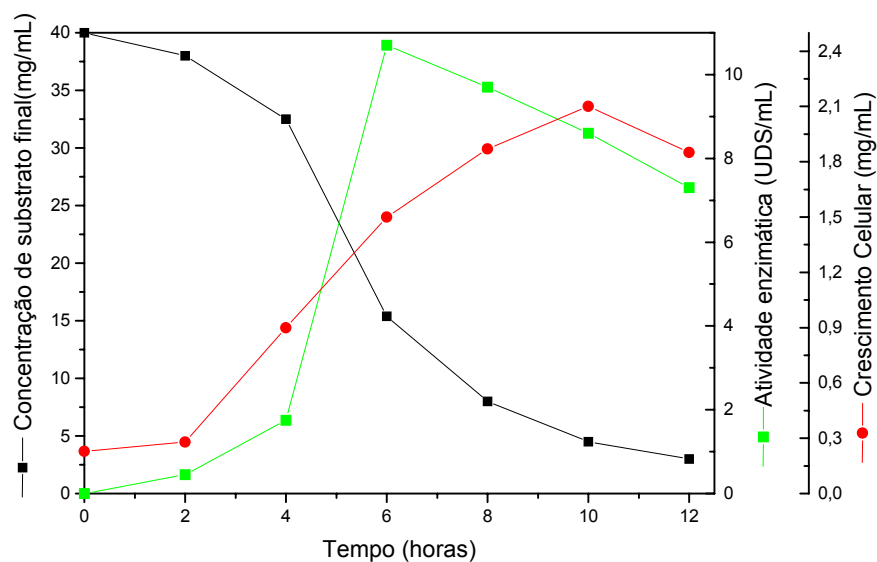


FIGURA 23: Atividade enzimática, crescimento celular e concentração de substrato final por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, crescendo em meio de cultivo M10, durante 12 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH inicial 7,4, 0,15 vvm, volume de meio de 1 litro.

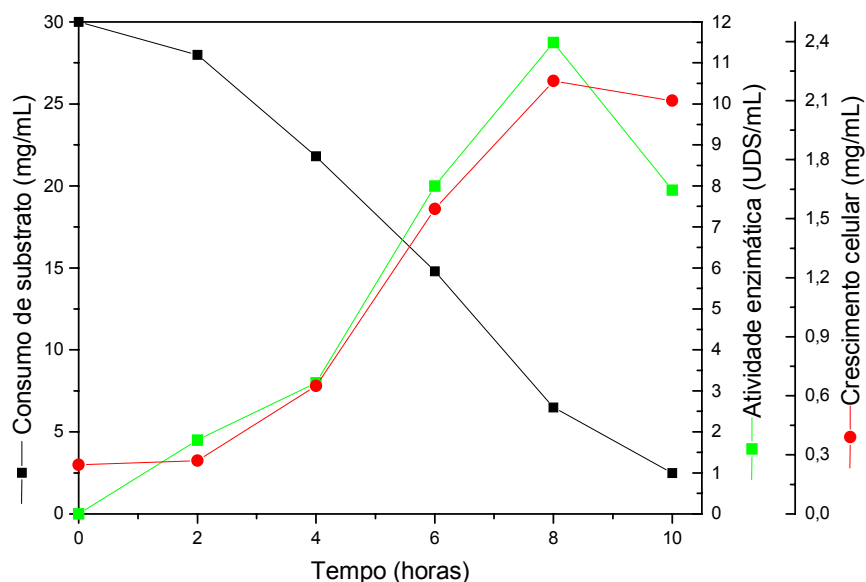


FIGURA 24: Atividade enzimática, crescimento celular e concentração de substrato final por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, em meio de cultivo M9, com adição de tween 80 (5%), durante 12 horas de fermentação. Condições: temperatura de 25°C, 132 rpm, pH inicia 7,4, 0,15 vvm, volume de meio de 1 litro.

A Figura 24 mostra o efeito de tween 80 na produção da enzima, indicando que este proporcionou um aumento de 6% na atividade enzimática quando comparado ao mesmo meio utilizado, porém sem a presença do detergente. Dentre as fermentações realizadas com sacarose, esta foi a que se obteve melhores resultados, sendo que com 8 horas de cultivo a atividade enzimática foi de 11,5 UDS/mL. O crescimento celular foi inferior ao obtido sem a adição de tween 80.

A adição de tween 80 no meio de cultivo também foi estudada por Goyal e Katiyar (1997), mostrando que a adição de tween 80 (0,5%) no meio de cultivo estimulou a produção de dextranasacarase

aumentando em 25% a atividade, porém não tendo efeito sobre o crescimento do microrganismo.

7.7 Determinação do crescimento específico de *Leuconostoc mesenteroides*

De acordo com o item 6.12, determinou-se a velocidade específica de crescimento para o microrganismo estudado, encontrando valor de $0,47 \text{ h}^{-1}$. Quando se utiliza a equação $\ln(x/x_0) = \mu t$ o tempo de duplicação para esse microrganismo é de 1,47 horas.

7.8 Síntese de dextrana e determinação da viscosidade intrínseca

Considerando que a produção da dextrana ocorre com aumento da viscosidade do meio reacional, realizou-se uma síntese onde a viscosidade foi determinada em diferentes tempos de reação, conforme tabela 7.

TABELA 7: Viscosidade durante a reação de síntese da dextrana.

Tempo de reação (h)	Viscosidade (poise)
0	1,45
8	345,00
24	10.394,38

Observa-se que a viscosidade aumenta com o tempo de reação entre enzima e substrato, fato este que evidencia a produção do polímero dextrana (Tabela 7).

7.9 Caracterização da dextrana através de infravermelho

No sentido de avaliar a presença de alguns grupos funcionais importantes presentes nas moléculas de dextrana, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada.

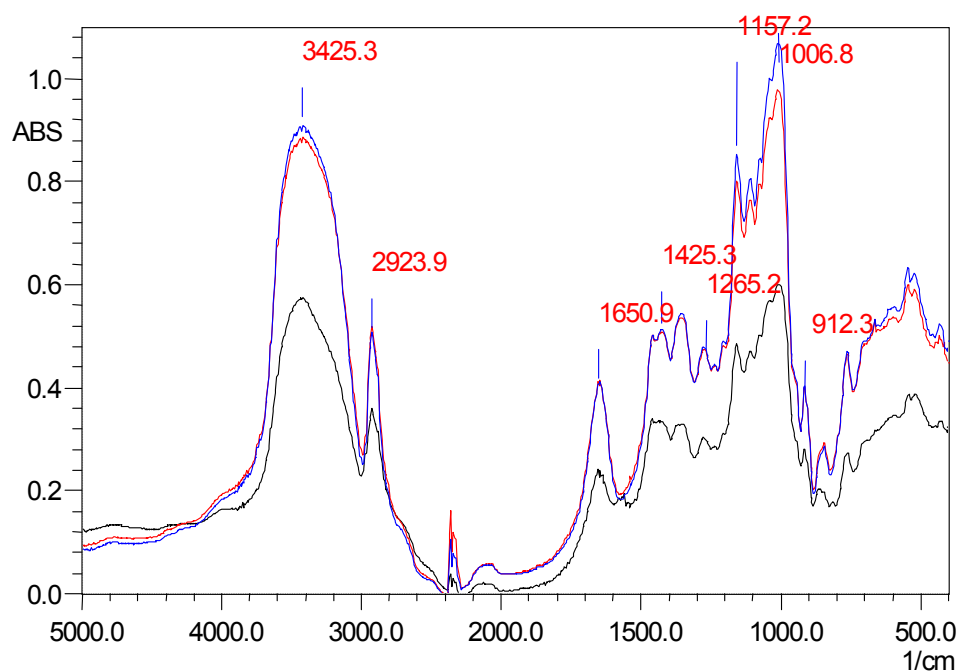


FIGURA 25: Espectro de absorção de FTIR do polímero sintetizado (°), 515.000 (°) e 9.300 (°).

Através da Figura 25 pode-se observar o espectro do polímero sintetizado, e dos padrões de massas molares 515.000 e 9.300 Da,

onde observa-se bandas características de absorção das dextranas a 3421.5 cm^{-1} , indicativa da deformação axial de grupos OH, a 2927.7 cm^{-1} atribuída à deformação de grupos CH.

Também se verifica uma banda, à 1650.9 cm^{-1} , atribuída à deformação do grupo acetal, e outra à 1425.3 , a qual se atribui à deformação angular do grupo C-H.

Na região de 1265.2 cm^{-1} é observada uma banda definida, atribuída à deformação angular do metileno (CH_2).

Observa-se a 912.3 cm^{-1} , uma banda, a qual é atribuída à deformação angular fora do plano do grupo OH.

7.10 Determinação da Massa Molar do polímero sintetizado.

Considerando a importância que tem a massa molar média de um polímero bem como a sua distribuição para a compreensão do processo de síntese e também de suas propriedades, determinou-se a massa molar média da dextrana sintetizada, de acordo com o método viscosimétrico descrito no item 6.17.

Observa-se que a viscosidade intrínseca aumenta com o aumento da massa molar, fato esse observado por Tirtaatmadja et al (2001), permitindo inferir um comportamento Newtoniano para as concentrações e massas molares estudadas, sendo que a dextrana sintetizada apresenta uma massa molar de aproximadamente 647000Da, conforme Figura 26.

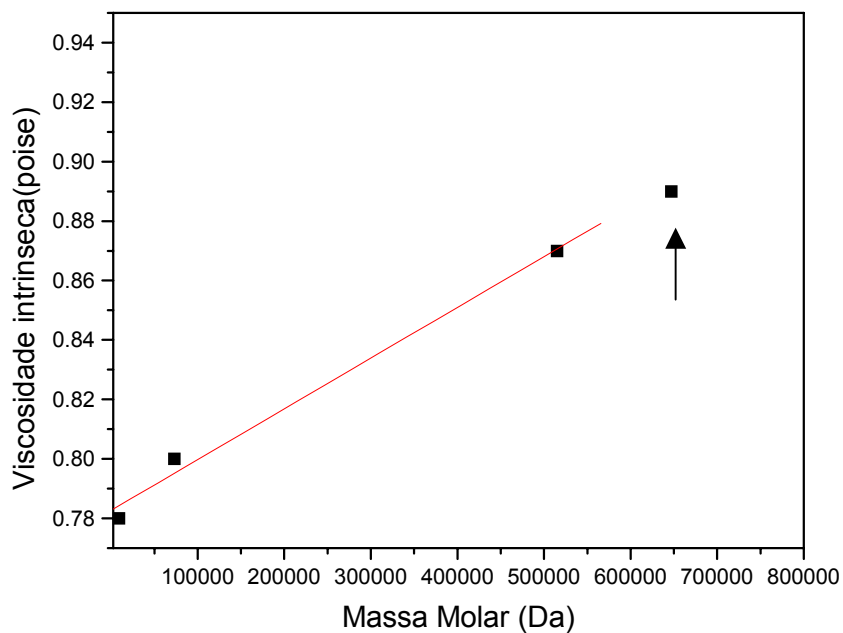


FIGURA 26: Determinação da massa molar da dextrana sintetizada pela enzima produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B. A seta indica a massa molar da amostra sintetizada (647.000 Da)

8. CONCLUSÃO

Nas fermentações realizadas sem controle de pH, o meio M5 foi o que favoreceu a melhor atividade enzimática (5,67 UDS/mL), o meio M7 foi o que favoreceu o maior crescimento celular (1,47 g/L);

Nas fermentações realizadas com controle de pH (6,0), as temperaturas de 23 e 25°C foram as que proporcionaram maiores atividades enzimáticas (3,2 UDS/mL para ambas). A temperatura de 29°C favoreceu o crescimento celular (1,42 g/L);

Nas fermentações realizadas com melaço substituindo a fonte de carbono tradicional e sem controle de pH pode-se constatar que a concentração que proporcionou maior atividade enzimática foi a de 97,3 g/L (25g/L de sacarose), onde foi possível atingir com 6 horas de cultivo uma atividade de 11,6 UDS/mL.

Nos estudos realizados com sacarose, as concentrações de 3% e 4%, resultaram em atividades próximas, 10,8 e 10,7 UDS/mL, ambas com 6 horas de fermentação. Já o crescimento celular foi maior quando se utilizou 3% de sacarose, sendo de 2,26 mg/mL.

A presença de tween 80 na concentração de 5% levou a um aumento de 6% na produção da enzima (11,5UDS/mL) em relação

fermentação sem a presença de tween 80, porém com 8 horas de cultivo.

Durante a síntese da dextrana ocorreu um aumento da viscosidade do meio reacional, indicativo este da presença da enzima polimerizando a glicose para produção de dextrana.

O espectro do polímero sintetizado foi comparado com amostras de dextrana comercial de massas molares 515.000 e 9.300 Da e apresentou semelhanças.

O polímero sintetizado apresenta uma massa molar de aproximadamente 647000 Da.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, P. E.; GANETSOS, G.; AJONGWHEN, N. J. A novel approach to the production of clinical grade dextran. **Journal Chem. Technol. Biotechnol**, v. 57, p. 21 – 26, 1993.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação**. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., SCHMIDELL, M. *Biotecnologia Industrial- Engenharia Bioquímica*. 1ª ed. São Paulo; editora Edgard Blucher LIDA, 2001, v.2, cap. 9 e 10, p. 193-218.

CHELLAPANDIAN, M. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from “pulque”, a traditional Aztec alcoholic beverage. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.21, p. 51-56, 1998.

COLÔNIA *Leuconostoc mesenteroides*. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com>>. Acesso em 17 Fevereiro 2003.

CORTEZI, M.; CONTIERO, J. **Efeito da Temperatura na Produção de Dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F.** 2001, 46 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

DADOS SOBRE A SUÉCIA. 2003. Disponível em: <<http://www.sweden.se/upload/swedwnse/otherlanguage/factesheets>> Acesso em 3 Dez. 2003.

DEXTRAN: 50 years. 2001. Disponível em: <<http://www.apbiotech.com/product/publication/>> Acesso em : 15 Março 2002.

DOLS, M. REMAUD-SIMEON, M. VILLEMOT, R. M., VIGNON, V. and MONSAN, P. Characterization on the different dextranucrase excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 1299. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n.4, p. 1298-1302, 1998.

DOMAN, K. and ROBYT, J. F. Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B742 constitutive for dextranucrase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 689-695, 1995.

ESTRUTURA DE POLÍMEROS. Disponível em: <<http://www.ehu.es/biomoléculas/HC/SUGAR.com>> Acesso em 17 Fevereiro de 2003.

EUROPEAN PATENT OFFICE. Apresenta informações sobre patentes na Europa. Disponível em: < <http://www.ep.espacenet.com>>. Acesso em 20 Maio 2002.

GIRARD, E.; LEGOY, M.D. Activity and stability of dextrans from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL R 512 (F) in the presence of organic solvents. **Enzyme and microbial technology**, v. 24, p. 425 – 432, 1999.

GOYAL, A.; KATIYAR, S. S. Effect of certain nutrients on the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F. **Journal Basic Microbiology**. v. 37, n. 3, p. 197-204, 1997

GOYAL, A; NIGAN, M.; KATIYAR, S. S. Optimal conditions for production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F and its properties. **Journal Basic Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 375-384, 1995.

GUIMARAES, D. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. F. **Otimização das condições de síntese e hidrólise de dextrana**. In: SINAIFERM, XII, 1998, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 1 CD Rom.

KAMAL, F.; SAMADI, N.; ASSADI, M. M.; MOAZAMI, N.; FAZELI, M. **Mutagenesis of *Leuconostoc mesenteroides* and selection of dextransucrase hyperproducing strains**. Disponível em: <<http://www.tums.ac.ir/daru/archive01>>. Acesso em: 10 jan. 2003.

LANDON R S.; WEBB, C. Separation enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. **Process Biochem**, v. 25, p. 19 – 23, 1990.

LOPRETTI, M; MARTINEZE, E; TORRES, L.; PERDOMO. R.; SANTOS, M.; RODRIGUES, R. E. Influence of nitrogen/carbon ratio and complementary sugars on dextransucrase production by *L. mesenteroides* NRRL B 512 (f). **Process Biochemistry**, v. 34, p. 879 – 884, 1999.

MAUGERI, F. F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, L. **Biotecnologia Industrial**- 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher LIDA, 2001, v. 3, cap.6, p.125-149.

MIBIELLI, G.M.; MAUGERI, F. F. **Biosíntese “in vitro” de dextrana clínica**. In: Congresso de Engenharia de Processos do Mercosul, v.2., 1999. Florianópolis. Anais...Florianópolis: II Congresso de Engenharia de Processos do Mercosul,, 1999.

MILLER, W. A and ROBYT J. F. Activation and inhibition of by calcium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 880, p. 32-39, 1986.

NELLY, W. B. Dextran: structure and synthesis. **Adv. Carbohydr. Chem.** v.15, p. 341 – 369, 1960.

OLIVEIRA, P.A P.L.V. **Influência das condições de cultivo na produção de CGTase por *Bacillus sp* alcalofílico**. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual paulista, Rio Claro, 2002.

PUMPHREY, B.; JULIEN, C. **An Introduction to Fermentation**, 1996. Disponível em <<http://www.nbsc.com/papers/fermbas.doc>>. Acesso em 20 de Setembro de 2001.

QUEIROZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de Dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. 119 f. Tese (Mestrado)- Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, p. 15 – 21, 1987.

RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. **Estudo da produção de dextranasacarase em função do crescimento celular de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F**. In: SINAFERM, XIV, 2003, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1 CD Rom.

ROGAN, J. Apresenta **informações sobre patentes nos Estados Unidos**. Disponível em: < [http:// www.uspto.gov](http://www.uspto.gov)> Acesso em: 20 Maio 2002.

ROMERO, G.; GONZALES V, C. **Certificado de patente de Invención**. Cuba, 1982. Disponível em: <<http://www.ocpi.cu/doc/1955/t6493>> Acesso em 26 Jan. 2004.

SABATIE, J.; CHOPLIN, L.; MONSAN, P. The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. **Biotech. Letters**, v. 8, p. 425 – 425, 1986.

SANTOS, M.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *L. mesenteroides* NRRL B 5125 (f). **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 177 – 188, 2000.

SCHIMEDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, L. **Biotecnologia Industrial**- 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher LIDA, 2001, v.2, cap.2, p.5-18.

SIDEBOTHAM, R. L. Dextrans. Adv. Carbohydr. **Chem. Biochem**, v. 30, p. 371-444, 1974.

SUTHERLAND, L. W. **Microbial exopolysaccharide syntesis** In: SANTDFORD P.; LASKIN. A. (Ed.) Extracellular microbial polysaccharides. Washington: American Chemical Society, 1977. p. 299-313 (ACS Symposium Series, 45).

SUZUKI R, H; OZAWA, Y; MEDA, H. Studies of water insoluble yeast invertase. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 30, p. 807 – 812, 1988.

TIRTAATMADJA, V.; DUNSTAN, D. E. and BOGER, D. V. Rheology of dextran solutions. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mech.**, v.97, p. 295-301, 2001.

TSUCHIYA, H. M; KOEPSSELL. H. J; CORMAN, J.; BRYANT, G.; BOGART, M. O.; FEGER, V. H. and JACKSON, B. W. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *L. mesenteroides*. **Journal Bacteriology**, v. 64, p. 512 – 526, 1952.

UI-QADER, S. A.; IGBAL, L.; RIZVI, H, A; ZUBERI, R. Production of dextran from sucrose by a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* (PCSIR-3) with reference to *L. mesenteroides* NRRL B-512 F. *Biotechnol. Appl. Biochem*, v. 34, p. 93-97, 2001.

VETJKOVIC, V. B.; LAZIC, M. L.; RUTIC, D. J.; JOVANOVIC, S. M.; SKALA, D. U. Effects of aeration on extracellular dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme Microb. Technol.** v.14, p. 665-668, 1992.